

ZUM VORKOMMEN TOXINBILDENDER ASPERGILLEN UND PENICILLIEN IM RINDERKOT

vorgelegt von
Harold Schreiber
aus München
München 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0050

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr.DDr. h.c. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau Prof.Dr. B. Gedek

ZUM VORKOMMEN TOXINBILDENDER ASPERGILLEN
UND PENICILLIEN IM RINDERKOT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tierärztlichen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Harold Schreiber
aus München

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. B. Gedek

Korreferent: Prof. Dr. H. Erbersdobler

Tag der Promotion: 25.7.80



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	3
2.1 Systematische Zugehörigkeit der Schimmelpilze	3
2.2 Kontamination von wirtschaftseigenen Futter- mitteln mit Schimmelpilzen unter besonderer Berücksichtigung des Gärfutters	6
2.3 Vorkommen von Schimmelpilzen im Verdauungs- trakt von Nutztieren und deren Exkrementen	9
2.4 Resistenz der Schimmelpilze, insbesondere ihrer Sporen, gegenüber äußeren Einflüssen	11
2.4.1 Thermoresistenz	11
2.4.2 Resistenz gegenüber erniedrigtem O ₂ -Partial- druck	14
2.4.3 Resistenz gegenüber Milieueinflüssen der Ver- dauung	14
2.4.4 Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit bei der Magen-Darmpassage	16
2.5 Mykotoxinbildung durch Schimmelpilze unter besonderer Berücksichtigung der Arten der Gattungen <i>Aspergillus</i> und <i>Penicillium</i>	20
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	27
3.1 <u>Material und Methoden</u>	27
3.1.1 Herkunft des Untersuchungsmaterials und Entnahme der Kotproben	27
3.1.2 Anzüchtung der Schimmelpilze aus dem Unter- suchungsmaterial und deren quantitative Er- fassung	27
3.1.3 Isolierung, Konservierung und Identifizierung der <i>Aspergillen</i> und <i>Penicillien</i>	29
3.1.4 Anreicherung der toxischen Metaboliten der isolierten Schimmelpilze	30

	Seite
3.1.5 Extraktion der in YES-Medium angereicherten Schimmelpilzkulturen	30
3.1.6 Verfahren der qualitativen Mykotoxinbestimmung	31
3.1.6.1 Dünnschichtchromatographie	31
3.1.6.2 Mäusetoxizitätstest	35
3.2 <u>Ergebnisse und deren Besprechung</u>	36
3.2.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchungen	36
3.2.1.1 Nachweisbarkeit von Schimmelpilzen im Rinderkot und deren Identifizierung	36
3.2.1.2 Keimbesatz der in den Betrieben der Kotentnahme gezogenen Futtermittelproben	36
3.2.2 Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchungen	38
3.2.2.1 Bestimmung definierter Toxine in Kulturextrakten der isolierten Schimmelpilzstämme mittels Dünnschichtchromatographie	38
3.2.2.2 Überprüfung des Toxinbildungsvermögens der in YES-Medium angereicherten Schimmelpilzstämme im Mäusetoxizitätstest	42
4. DISKUSSION	48
5. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	57
6. LITERATURVERZEICHNIS	61

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

"More critical work is needed with particular fungi and comparisons made of the fungal flora of the food ingested by particular animals with that of their faeces " (JOHNSON and PREECE, 1979).

Seit 1961 die Aflatoxine im Erdnußschrot als hochtoxische Stoffwechselprodukte des darin nachgewiesenen *Aspergillus flavus* in England entdeckt und als Ursache für ein zunächst rätselhaftes Massensterben von Truthühnern und Enten erkannt wurden, erhielt die Mykotoxinforschung einen erheblichen Aufschwung.

Inzwischen sind weit über hundert verschiedene Mykotoxine, gebildet von mehr als zweihundert Pilzarten, nachgewiesen worden, und ihre Zahl nimmt ständig zu.

Es stellte sich heraus, daß toxinproduzierende Pilze vor allem den Schimmelpilzen zuzuordnen sind, von denen wiederum *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten den überwiegenden Anteil bilden. Relativ umfangreich sind unsere Kenntnisse bereits über die unterschiedlichen toxischen Wirkungen dieser Metaboliten des Sekundärstoffwechsels von Pilzen. Ebenso liegen zahlreiche Untersuchungen über das Vorkommen der toxinproduzierenden Arten in den einzelnen Lebens- und Futtermitteln vor. Weitgehend unbekannt ist dagegen, ob mit der Nahrung aufgenommene Pilzsporen der toxinbildenden Schimmelpilze nach der Magen-Darmpassage noch lebensfähig im Kot landwirtschaftlicher Nutztiere, deren Futtermittel sich nach dem Ergebnis von Keimgehaltsbestimmungen hauptsächlich mit Schimmelpilzen als kontaminiert erwiesen haben, erscheinen und ob gegebenenfalls unter dem Einfluß des Magen-Darm-Milieus eine Selektion zugunsten derartiger Spezies erfolgt.

Bedenkt man, daß die in der Tierischen Produktion in großen Mengen anfallenden Exkremente über die Düngung stets wieder in den biologischen Kreislauf gelangen, so verdient die Ausscheidung von Pilzen, vor allem

wenn sich darunter potentielle Toxinbildner befinden, Beachtung. Wegen des heutzutage bereits vielfach praktizierten Kotrecyclings ist auch die Möglichkeit einer gewissen Toxinanreicherung im Substrat Kot nicht unbedeutend. HENDRICKSON und GRANT (1971) beimpften sterilisierten Kot in frischem und teilweise zersetztem Zustand mit *Aspergillus flavus*-Sporen und konnten daraufhin Aflatoxine darin nachweisen.

Aufgrund dieses Sachverhalts bestand meine Aufgabe darin, erstens Kot von Rindern auf das Vorhandensein lebensfähiger Schimmelpilzsporen zu untersuchen. Damit gegebenenfalls eine Beziehung zu den mit dem Futter aufgenommenen Schimmelpilzen hergestellt werden kann, sollten in die Untersuchungen auch die hauptsächlich im Bestand eingesetzten wirtschaftseigenen Futtermittel einbezogen und auf ihren Schimmelpilzgehalt überprüft werden.

Zweitens sollten die aus dem Kot der Tiere züchtbaren Schimmelpilze, insoweit es sich dabei um Arten der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* handelte, mit bewährten Verfahren auf ihre Befähigung zur Bildung von Mykotoxinen, die bereits als Hepatotoxine, Nephrotoxine oder Neurotoxine näher definiert sind, oder die aufgrund von Tierexperimenten als potente Karzinogene anzusehen sind, untersucht werden.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Systematische Zugehörigkeit der Schimmelpilze

Die Pilze gehören nach MÜLLER und LOEFFLER (1971) zu den chlorophyllosen Thallophyta (Lagerpflanzen). Sie werden seit 1974 dem Reich der Mycota zugeordnet (ROLLE und MAYR, 1978). Der Vegetationskörper der Schimmelpilze (Thallus) besteht in der Regel aus Hyphen, das heißt aus feinen, fadenförmigen Röhren, die miteinander vernetzen und ein Geflecht bilden, das als Myzel bezeichnet wird.

"Dem unbewaffneten Auge erscheinen Schimmelpilze als weiße oder farbige, dünne, flockige oder wollige Überzüge." (MÜLLER, 1974) Diese Überzüge können sowohl von einem Rasen steriler Hyphen als auch von fruktifizierenden Konidienträgern oder mikroskopisch kleinen Fruchtkörpern wie Perithezien gebildet sein (LOEFFLER, 1965). Die Schimmelpilze werden also nach den morphologischen Gegebenheiten des äußeren Erscheinungsbildes zu einer großen Gruppe von Pilzen zusammengefaßt, die aber nach ihrer systematischen Stellung verschiedenen Klassen angehören. Über ihre Zugehörigkeit zu verschiedenen Gattungen innerhalb der einzelnen Klassen informiert die nachstehende Tabelle (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten Schimmelpilzgattungen und deren unmittelbare Verwandte mit ubiquitärer Verbreitung (GEDEK, 1980)

Unterabteilung: Zygomycotina	Unterabteilung: Ascomycotina
Klasse: Zygomycetes	Klasse: Plectomycetes (Euascomyceten)
Ordnung: Mucorales	Ordnung: Eurotiales
Gattung: Absidia VAN TIEGHEM	Gattung: Byssosclamyces WESTLING
Haplosporangium THAXT.	Emericella BERK. et BR.
Mortierella SCHRÖTER	Eupenicillium LUDW.
Mucor MICH. et FR.	Eurotium LINK et FR.
Phycomyces KUNZE	Monascus VAN TIEGHEM
Rhizopus EHRENB. ex CORDA	Neosartorya MALLOCH et CAIN.
Syncephalastrum SCHRÖTER	Talaromyces BENJ.
Thamnidium LINK ex WALLR.	Thermoascus MIEHE
Zygorhynchus VUILL.	Thielavia ZOPF
Ordnung: Entomophthorales	Ordnung: Chaetomiales
Gattung: Entomophthora FRES.	Gattung: Chaetomium KUNZE
Basidiobolus EIDAM	Ordnung: Sphaerales
	Gattung: Neurospora SHEAR et DODGE
	Sordaria CES. et DE NOT.
	Ordnung: Hypocreales
	Gattung: Calonectria DE NOT.
	Gibberella SACC.
	Nectria FR.

Fortsetzung Tabelle 1:

Unterabteilung: Deuteromycotina (Fungi imperfecti)

Klasse: Hyphomycetes

Ordnung: Moniliales

Gattung: Acremonium LINK ex FR.

Alternaria NEES ex FR.

Aspergillus MICH. ex FR.

Aureobasidium VIALA et
BOJ

Botrytis PERS. ex FR.

Chrysosporium
CARMICHAEL

Cladosporium LINK ex FR.

Curvularia BOED.

Cylindrocarpon
WOLLENWEBER

Dendrodochium BON.

Drechslera ITO

Emmonsia CF. et MT.

Epicoccum LK. et FR.

Fusarium LINK

Gliocladium CORDA

Helminthosporium LINK

Monilia PERS. ex FR.

Myrothecium TODE ex FR.

Nigrospora ZIMM.

Paecilomyces BAIN.

Penicillium LINK ex FR.

Phialophora MEDLAR

Pithomyces BERK. et BROOME

Scopulariopsis BAIN.

Stachybotrys CORDA

Stemphylium WALLR.

Thermomyces TSIKLINSKI

Torula PERS. ex FR.

Trichoderma PERS. ex FR.

Trichothecium LINK

Verticillium NEES ex LINK

Ordnung: Mycelia sterilia

Gattung: Rhizoctonia DC. ex FR.

Klasse: Coelomycetes

Ordnung: Sphaeropsidales

Gattung: Diplodia FR.

Phoma sensu SACC.

Phomopsis SACC.

Septoria SACC.

2.2 Kontamination von wirtschaftseigenen Futtermitteln mit Schimmelpilzen unter besonderer Berücksichtigung des Gärfutters

Zu den wirtschaftseigenen Futtermitteln werden die Samen verschiedener ernährungsphysiologisch wichtiger Getreidearten, die unter dem Begriff Cerealien zusammengefaßt sind, gerechnet, nämlich Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Mais und Hirse. Außerdem gehören Ölsamen, Hülsen- und Ölfrüchte, alle Arten von Grün- und Gärfuttermitteln sowie Trocken- grünfutter, Heu und Stroh dazu. Schließlich sind als Saftfuttermittel die verschiedenen Rübenarten und Kartoffeln zu nennen.

Die Schimmelpilzflora der Rohprodukte der einzelnen Futtermittel setzt sich primär aus dem jeweiligen Spektrum der Bodenpilze zusammen, die auf Blatt, Stengel, Samen- und Fruchtoberfläche der Futterpflanzen zu finden sind. Dazu kommen noch die ubiquitär verbreiteten Arten der Biotope der landwirtschaftlichen Betriebe und Lagerstätten (SCHMIDT, 1968; GEDEK, 1973).

Als sekundäre Kontaminationsquellen müssen Luft, Wasser, Insekten und Fäkalien berücksichtigt werden (LACEY, 1975; DIENER et al., 1976; MOUSTAFA und KAMEL, 1976; DICKINSON, 1977; PREECE und JOHNSON, 1978). Wenn auch mit unterschiedlicher Dominanz, setzt sich die Mykoflora der Rohprodukte der Futtermittel im wesentlichen folgendermaßen zusammen: Die hauptsächlichsten Vertreter stammen aus der Familie der Dematiaceae und von dieser sind es in erster Linie Arten der Gattung *Alternaria*. Daneben dominieren Vertreter der Gattungen *Helminthosporium*, *Epicoccum* und *Cladosporium*. Ferner sind Spezies der Gattungen *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* und *Penicillium* zu nennen (HYDE und GALLEYMORE, 1951).

Bei der Lagerung von Futtermitteln verschiebt sich das Pilzspektrum. Die zur Erntezeit dominierenden Arten sind vielfach nicht mehr nachweisbar. Dies trifft besonders für die Gattungen *Alternaria*, *Epicoccum*, *Helminthosporium* und *Fusarium* zu, die deshalb auch als Feldpilze be-

zeichnet werden (MISLIVEVC und TUIITE, 1970).

Nun treten die sogenannten Lagerpilze in den Vordergrund, die bei entsprechenden Umweltbedingungen zum Verderb des gelagerten Futtermittels führen können. Es sind dies hauptsächlich Vertreter der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, *Mucor* und *Rhizopus*, sowie einige *Fusarien*arten, z.B. *Fusarium moniliforme*.

Voraussetzungen für den Verderb von Gärfutter durch Schimmelpilze sind Fabrikationsfehler, wie ungenügende Steuerung des Gärprozesses und unzureichende Pressung der Pflanzenteile. Bauen von Luftsauerstoff unabhängige Hefen, die im allgemeinen auch niedrigere pH-Werte als die Schimmelpilze vertragen, die organischen Säuren ab, und kann Luft hinzutreten, setzt der Verderb durch Schimmelpilze ein.

Nach PELHATE (1977) ist in Maissilagen mancher Jahre vornehmlich *Monascus purpureogenus* nachweisbar. Regelmäßiger kommen *P. roqueforti* sowie *Trichoderma* spp., *Byssoschlamys* bzw. *Paecilomyces* spp. und Vertreter der Ordnung *Mucorales* darin vor. Von den daneben auftretenden *Aspergillus*arten ist vor allem *A. fumigatus* zu nennen (MILITZER, 1968; SMITH und LYNCK, 1973). LE BARS und ESCOULA (1973) untersuchten in Sorgho-, Mais- und Grassilage die Mykoflora von der Oberfläche der Anschnitte. Das Schimmelpilzmuster gleicht dem, das PELHATE (1977) nachwies. Häufig vertreten waren jedoch auch *P. granulatum* und *P. cyclopium*. Inwieweit sich die Dominanz einzelner Arten mit zunehmender Lagerdauer verändert, macht Tabelle 2 deutlich.

Tabelle 2: Vorkommen von Schimmelpilzen an der Oberfläche der Anschnitte in Abhängigkeit von der Lagerzeit (LE BARS und ESCOULA, 1973)

Lagerzeit in Monaten	am häufigsten nachgewiesene Arten
2	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium granulatum</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Fusarium</i> sp.
3	<i>Trichoderma</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
4	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Graphium</i> sp.
5	<i>Byssoschlamys nivea</i> , <i>Paecilomyces varioti</i>
6	<i>Byssoschlamys nivea</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Absidia corymbifera</i>

Während *Mucor hiemalis* und *Absidia corymbifera* die gesamte Lagerzeit hindurch nachzuweisen waren, gelang dies bei *Trichoderma viride* nur bis zum dritten Monat. Gegen Ende der Lagerung vermehrten sich vor allem *Byssoschlamys nivea* und *Paecilomyces varioti*. Das Vorkommen von *Penicillium granulatum* und *Penicillium cyclopium* ging mit zunehmender Lagerdauer zugunsten von *P. roqueforti* zurück. Die Verfasser testeten die isolierten Stämme *in vitro* auf ihr Wachstum unter anaeroben Verhältnissen. Unter diesen Bedingungen erwiesen sich alle Stämme der Ordnung *Mucorales* und der Gattung *Fusarium*, sowie fast alle der Ordnung *Eurotiales* als entwicklungsfähig. Von den *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten zeigte lediglich *A. clavatus* und ein nicht näher bestimmter *Penicillium*-Stamm Wachstum. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß zumindest ein Teil der Pilze in der Lage ist, sich auch im Inneren einer nicht verdorbenen Silage zu vermehren.

2.3 Vorkommen von Schimmelpilzen im Verdauungstrakt von Nutztieren und deren Exkrementen

Über die Besiedlung des Verdauungstraktes mit symbiontischen Pilzen wird von BAUCHOP (1979a, 1979b) berichtet. Er wies durch elektronenmikroskopische Untersuchungen im Pansen von Rind und Schaf eine große Anzahl in vivo und in vitro anaerob entwicklungsfähiger Schimmelpilze der Klasse Zygomycetes (niedere Pilze) nach. Diese sind im Panseninhalt vor allem an Stengeln und groben Fasern von Heu und Wiesen gras zu finden. Der Pilz dringt mittels seines Myzels in die Pflanze ein, und es kommt in der Pflanzenfaser zur Verdauung durch dessen lytische Enzyme (z.B. Cellulase). Auch im Wiederkäuermagen von verschiedenen Cerviden, sowie von Tieren mit wiederkäuerähnlichem Magen wurden diese Vorgänge beobachtet, ebenso im Dickdarm von Wiederkäuern, Pferden und afrikanischen Elefanten. *Sporomia minima* und *Mucor rouxii* sollen normale Bestandteile der Pansenpopulation sein, obwohl bisher ihre Isolierung nicht zu jeder Zeit möglich war (BREWER et al., 1972; vgl. auch 2.4.2). Die Mesenteriallymphknoten von 100 Schlachtrindern wurden von ANGUS (1973) mykologisch untersucht. Bei 18 Tieren wurden Granulomatome mit "Asteroid-Körpern" gefunden, 11 davon wiesen Pilzhyphen auf. Schimmelpilze ließen sich kulturell im Material von 18 Tieren ermitteln. Es handelte sich hauptsächlich um *A.fumigatus*, sowie *A.terreus* und Vertreter der Gattungen *Mucor*, *Scopulariopsis* und *Byssoschlamys*.

Den Inhalt von Ösophagus, Kropf und Drüsenmagen geschlachteter Masthähnchen untersuchte ALLER (1967) unter anderem auf das Vorkommen von Fadenpilzen. Bei 50,4 % der Tiere war kulturell der Nachweis von mucorähnlichen Arten, sowie von *A.fumigatus* und *A.niger* möglich. Hyphen konnten mikroskopisch nicht festgestellt werden. Die Häufigkeit des Vorkommens nahm vom Kropf über den Ösophagus zum Drüsenmagen hin ab.

Zum Vorkommen von Schimmelpilzen im tierischen Kot liegen bisher erst einige Untersuchungen vor: Aus dem Dickdarminhalt von Pflanzenfressern züchteten ROLLE und KOLB (1954) häufig *Absidia ramosa*, seltener *Mucor pusillus* und andere *Mucor*-Arten, sowie *Scopulariopsis brevicaulis*. *Aspergillus*-Arten wurden oft nachgewiesen, vor allem *A.fumigatus* und Vertreter der *A.glaucus*-Gruppe, außerdem *A.niger* und *A.flavus*. Ebenso waren Arten der Gattung *Penicillium* zahlreich vorhanden, die jedoch nicht weiter differenziert wurden. KLARE (1970, 1971) stellte im Schweinekot eine Gesamtkeimzahl an Schimmelpilzen von 7000 - 77 Mio. pro Gramm Trockenmasse fest, im Rinderkot 4000 - 5 Mio. Die Pilzflora wurde durch die Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* bestimmt, daneben kamen auch Vertreter der Gattungen *Mucor*, *Absidia*, *Cladosporium* und *Paecilomyces* vor.

Arten der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus* waren nach BOJARSKI (1970) auch im Geflügelkot die hauptsächlichen Vertreter der Schimmelpilze.

Zwischen der Schimmelpilzflora im Tierkörper und derjenigen in der Nahrung bzw. der Umwelt lassen sich gewisse Zusammenhänge feststellen. So wird eine direkte Beziehung zwischen der aus dem Panseninhalt von Weideschafen isolierten Pilzflora und der von Bodenproben des entsprechenden Weidelandes beschrieben (BREWER et al., 1971, 1972). Eine Übereinstimmung des Schimmelpilzspektrums in Sperma und Futtermitteln ist bei RICHTER (1975) beschrieben (vgl. 2.3.4). ROLLE und KOLB (1954) verglichen das Vorkommen von Schimmelpilzen in Futtermitteln, Speichel und Stalluft im gleichen Bestand. Sie stellten eine weitgehende Übereinstimmung fest.

Überwiegend *Aspergillen* und *Penicillien* fanden DAVIES und LEESE (1968) in den Faeces vom Menschen. Sie stellten fest, daß es annähernd die gleichen Spezies waren, die auch in der Nahrung vorkamen. Allerdings lassen sich bei mykologischen Stuhluntersuchungen nur selten entwicklungsfähige Schimmelpilzsporen isolieren. Die Ursache liegt

wohl darin, daß der Mensch, im Gegensatz zum Tier, nur selten pilzbefallene Nahrung aufnimmt (ROLLE und KOLB, 1954; SEELIGER und GEDEK, 1967).

2.4 Resistenz der Schimmelpilze, insbesondere ihrer Sporen, gegenüber äußeren Einflüssen

2.4.1 Thermoresistenz

Nach MÜLLER und LOEFFLER (1971) lassen sich die Pilze nach ihrer Temperaturabhängigkeit vier Gruppen zuordnen (Abb. 1). Die psychrophilen Pilze sind hauptsächlich Pflanzenparasiten und zeigen Wachstum nur im Temperaturbereich unter +25°C. Zu der Gruppe der mesophilen Pilze gehören die meisten Schimmelpilze. Ihre Minimaltemperatur liegt häufig bei etwa 0°C, das Wachstumsoptimum bei +25°C und die Maximaltemperatur zwischen +30 und 40°C. Zu den thermotoleranten oder fakultativ thermophilen Pilzen zählt eine Gruppe von Schimmelpilzen, deren Minimaltemperatur bei ca. 0°C liegt. Das Wachstumsoptimum ist zwischen +30 und 40°C, die Maximaltemperatur zwischen +45 und 55°C anzusetzen. Obligat thermophile Pilze sind einige Schimmelpilze mit Minimaltemperatur über +25°C und Wachstum noch bei +60°C.

Die Minimaltemperaturen sind wenig artspezifisch und auch relativ ungenau festzustellen. Die Maximaltemperaturen dagegen sind genau definiert und meist art- und gruppenspezifisch. So kann zum Beispiel die Ascomycetengattung *Eurotium* nach BLASER (1976) in drei Gruppen von Arten unterteilt werden: Die *E.-amstelodami*-Gruppe, die *E.-herbariorum*-Gruppe und die *E.-echinulatum*-Gruppe. Die Maximaltemperaturen liegen bei ihnen bei 43°C, 37 - 40°C resp. 30 - 33°C.

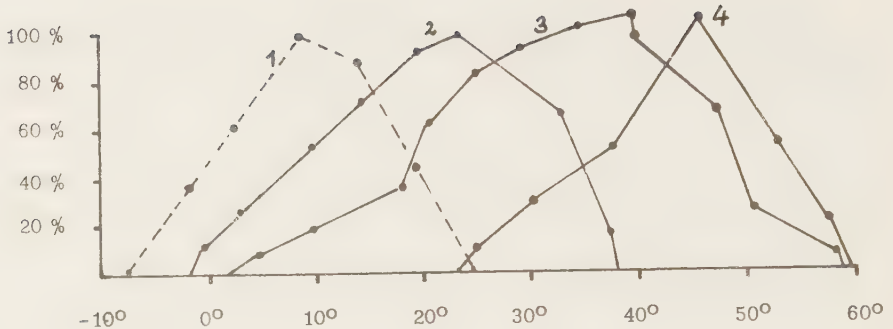


Abb. 1: Temperaturabhängigkeit des Schimmelpilzwachstums (nach MÜLLER und LOEFFLER, 1971)

1 Psychrophilie

2 Mesophilie: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*,
Alternaria, *Cladosporium*, *Mucor*,
Rhizopus

3 Thermotoleranz: *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*,
A. oryzae, *A. niger*, *Rhizopus microsporus*,
Rh. oryzae, *Rh. oligosporus*

4 Thermophilie: *Mucor miehei*, *M. pusillus*, *Talaromyces*
emersonii

Über die Hitzeresistenz der vegetativen Sporen oder Konidien liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Eingehender untersucht sind nur die stärker hitzeresistenten Ascosporen und Sklerotien von einigen Arten der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium*, vor allem aber der Gattung *Byssosclamyces*.

Nach NELSON und WILHELM (1958) werden die Konidien von *Verticillium albo-atrum* bereits bei einer Erhitzung auf 47°C, über 10 Minuten lang, abgetötet, während Microsklerotien eine über 40 Minuten lange Erhitzung überstehen.

Sporen von *Rhizopus stolonifer* werden erst nach 10 Minuten Erhitzung bei 100°C abgetötet (SOMMER et al., 1974). Die Konidien von *Neurospora* werden bei feuchter Hitze bei 72°C nach 5 Minuten abgetötet, bei trockener

Hitze erst nach 30 Minuten Erhitzung bei 120°C (SHEAR und DODGE, 1927).

Bei den Untersuchungen von DOYLE und MARTH (1975a, 1975b) zeigte sich, daß die Hitzeresistenz der Konidien von aflatoxinbildenden *A.flavus*-Stämmen stark stammspezifisch war. Sie erhöhte sich mit der zunehmenden Fähigkeit der Stämme zur Aflatoxinbildung.

Ascosporen der Pilzgattung *Byssoschlamys* mit ihrer imperfekten Form der Gattung *Paecilomyces* sind sehr hitzeresistent. Die Angaben von BAUMGART und STOCKSMEYER (1976) schwanken von 30 Minuten bei 85°C bis zu 10 Minuten bei 96°C für *Byssoschlamys fulva*. Nach den Untersuchungen von SPLITTSTOESSER et al. (1971) bildeten folgende Arten hitzeresistente Ascosporen, die nach einstündiger Erhitzung bei 80°C noch nicht abgetötet waren: *A.fischeri* var. *spinosus*, *A.fumigatus*, *P.vermiculatum* und *P.ochrochloron*. Nach DOYLE und MARTH (1975a, 1975b) beeinflussen folgende Faktoren die Hitzeresistenz:

- Alter der Mikroorganismenzelle
(Gealterte Pilzkolonien sind resistenter als junge, Zellen aus stationärer Phase resistenter als aus exponentieller Phase)
- pH-Wert
(Resistenz nimmt mit zunehmender Acidität stark ab)
- NaCl-Konzentration
(Wert unter 4%-Erhöhung der Resistenz, Wert über 4%-Erniedrigung)
- Erhöhung der Zuckerkonzentration
(Resistenz nimmt zu)
- H₂O-Gehalt, bzw. a_w -Wert
(bei dessen Abnahme im Substrat Hitzeresistenz stark erhöht)
- Fett und Proteine
(im Substrat führen zu Erhöhung der Resistenz)

2.4.2 Resistenz gegenüber erniedrigtem O₂-Partialdruck

BREWER et al. (1972) isolierten aus dem Panseninhalt von Weideschafen unter anderem die Arten *A. fumigatus* und *Mucor rouxii*. Sie testeten sie unter den gleichen niedrigen O₂-Partialdruckbedingungen wie sie im Pansen vorherrschen. Die Ergebnisse zeigten nicht nur Atmung, sondern auch Wachstum der beiden Schimmelpilzarten. Daß Arten der Gattung *Byssoschlamys* noch bei relativ niedrigem O₂-Partialdruck wachsen können, wurde durch Untersuchungen von REHM (1970) bestätigt.

2.4.3 Resistenz gegenüber Milieueinflüssen der Verdauung

Pilze bevorzugen nach BLASER (1977) Medien mit einem pH-Wert zwischen 4,5 und 6,5. Im alkalischen Bereich ist ihr Wachstum eingeschränkt. Über pH 8,5 wachsen nur noch wenige Pilze. Die untere Wachstumsgrenze im unteren Bereich des sauren Milieus liegt für die meisten Pilze zwischen pH 2 und pH 3.

Viele Schimmelpilzstämme können den pH-Wert nach unten verändern. LAUBER (1971) konnte bei Isolaten von *Botrytis cinerea* auf einem Medium mit einem Anfang-pH-Wert von 4,6 ein Absinken der Werte zwischen pH 2,2 und 3,4 durch Bildung von Zitronensäure beobachten.

Die pH-Abhängigkeit des Milieus hat Einfluß auf verschiedene Enzymsysteme oder Funktionen. So stellte SMALL (1946) für verschiedene Enzymsysteme von *A. oryzae* unterschiedliche pH-Optima fest. Es liegen Untersuchungen vor, in denen aufgezeigt wird, daß zwar Wachstum noch in sehr niedrigen pH-Bereichen stattfindet. Ausbildung von Fruktifikationsorganen findet jedoch erst im höheren sauren Bereich statt (MÜLLER, 1966).

Nimmt man die Angaben über die pH-Werte im Inhalt des Magen-Darmtraktes bei verschiedenen Wirbeltieren als Grundlage (vgl. Tabelle 3), so kann lediglich das pH-Milieu im hinteren Abschnitt des Magens als ungünstig für Schimmelpilze angesehen werden.

Untersuchungen über Resistenzen der Schimmelpilze gegenüber Verdauungsenzymen liegen nach Durchsicht der Literatur nicht vor. HRUBÝ und MARESOVA (1970) prüften die mikrobizide Wirkung von zwölf Magensäften mit verschiedenen pH-Werten und von zehn Duodenalsäften auf unterschiedliche Bakterien und Hefen. Magensaft wirkte nur bei niedrigem pH und dann - mit einer Ausnahme - lediglich mikrobiostatisch. Eine mikrobizide Wirkung des Duodenalsaftes wurde nicht bestätigt, so daß die antimikrobielle Barriere von Verdauungssäften anscheinend ohne Bedeutung ist.

Tabelle 3: pH-Werte des Inhalts der verschiedenen Abschnitte des Verdauungstraktes von 12 verschiedenen Wirbeltieren (mod. nach SMITH, 1965)

Tierart (Anzahl d. untersuch- ten Tiere)	pH-Wert des Inhalts von								
	Magen		Dünndarmabschnitt				Caecum	Colon	Faeces
	v.A.	h.A.	1	3	5	7			
Affe (3)	4,8	2,8	5,6	5,8	6,0	6,0	5,0	5,1	5,5
Hund (3)	5,5	3,4	6,2	6,2	6,6	7,5	6,4	6,5	6,2
Katze (6)	5,0	4,2	6,2	6,7	7,0	7,6	6,0	6,2	7,0
Rind (3)	6,0	2,4	6,7	7,0	7,3	7,9	7,0	7,4	7,5
Schaf (3)	6,4	3,0	5,7	6,6	7,7	6,0	7,3	7,8	8,0
Pferd (3)	5,4	3,3	6,7	7,0	7,3	7,9	7,0	7,4	7,5
Schwein (22)	4,3	2,2	6,0	6,2	6,9	7,5	6,3	6,8	7,1
Kaninchen (11)	1,9	1,9	6,0	6,8	7,5	8,0	6,6	7,2	7,2
Ratte (7)	5,0	3,8	6,5	6,7	6,8	7,1	6,8	6,6	6,9
Maus (3)	4,5	3,1	-	-	-	-	-	-	-
Huhn (6)	4,9	4,2	5,8	6,2	7,0	7,8	7,0	-	7,6
Ente (3)	5,0	4,5	6,1	6,5	7,4	8,0	-	-	7,3

v.A. = vorderer Abschnitt des Magens

h.A. = hinterer Abschnitt des Magens

Faeces = Inhalt des hinteren Rektums

2.4.4 Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit bei der Magen-Darmpassage

JOHNSON und PREECE (1979) prüften, ob Sporen des koprophilen Pilzes *Pilobolus kleinii* im Verdauungstrakt des Rindes keimten und ob die Keimfähigkeit nach der Magen-Darmpassage erhalten geblieben war. Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung beschrieb er folgendermaßen: Im Pansenmilieu fand innerhalb von 48 Stunden keine Keimung statt. Ebenso konnte keine Keimung und Hyphenbildung nach der Passage durch den Verdauungstrakt festgestellt werden. Die anschließend geprüfte Keimfähigkeit unterschied sich nur wenig von derjenigen der Vergleichssporen.

Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen von ROLLE und KOLB (1954) bestätigt: In den Pansen eingebrachte Sporen zeigten in Nativpräparaten keine Keimung. Außerdem nahm die Menge stetig ab. Die Myzelien, gleichfalls in den Pansen eingegebener Pilzkulturen, waren bereits nach 6 Stunden nur mehr in Form von Fragmenten vorhanden. Sie waren in großer Zahl von Bakterien besetzt, welche an ihrer Oberfläche Vertiefungen in Form von "Freßbetten" erzeugten. "Hyphen und Myzelien, die mit dem Futter in den Pansen gelangen, werden infolge ihrer Zartheit durch die dauernden Kontraktionen bei der Durchmischung zerrieben und fallen der bakteriellen Zersetzung anheim" (ROLLE und KOLB, 1954, S. 418). ROLLE und KOLB (1954) berichten weiterhin, daß sie aus dem Darminhalt von Pflanzenfressern verschiedene Gattungen der Ordnung Mucorales und etliche Arten der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* züchten konnten. In Nativpräparaten des Darminhaltes jedoch ließen sich in keinem Falle Hyphen oder Myzelien dieser Schimmelpilze einwandfrei nachweisen. Dagegen nehmen BREWER et al. (1972) an, daß die bei ihren Versuchen unter simulierten Pansenmilieubedingungen überlebenden bzw. sogar wachsenden Spezies *A.fumigatus* und *Mucor rouxii* auch die Passage durch den Magen-Darmtrakt lebend überstehen würden.

Erhalten Mäuse und Meerschweinchen große Mengen von Sporen der

Arten *Absidia ramosa* und *A.fumigatus* mit dem Futter verabreicht (ROLLE und KOLB, 1954), waren diese bereits einen Tag danach kulturell in den Faeces nachweisbar, jedoch nicht mehr nach Absetzen der sporenreichen Nahrung. Es scheint daraus hervorzugehen, daß die Sporen den Magen-Darmkanal passieren ohne zu keimen. Auch SEELIGER und GEDEK (1967) kamen zu dem Schluß, daß die Mehrzahl der im Kot noch lebensfähigen Pilze Passanten sind. Ihre Sporen gelangen über die Nahrung in den Körper und werden, ohne zu keimen, wieder ausgeschieden. Solches Verhalten zeigen vor allem konidien- oder sporangio-sporenbildende Pilze, demnach insbesondere Schimmelpilze.

Über die Verweildauer der Sporen im Organismus liegen Untersuchungen von THURSTON et al. (1979) vor. Kaninchen wurden einer einmaligen Beatmung mit Sporen von *A.fumigatus* und einer *Penicillium* sp. ausgesetzt bzw. brachte man die Sporen direkt in den Magen ein und führte in Abständen mikroskopische und kulturelle Untersuchungen durch. Inhalierter Sporen wurden frühestens nach einer Stunde bis maximal 6 Tage aus dem Magen-Darmtrakt isoliert, wobei es sich offensichtlich um abgeschluckte Sporen handelte. In den Magen eingebrachte Sporen ließen sich aus dem Magen-Darminhalt nur bis zum 4. bis 7. Tag nach der Exposition nachweisen, bis zum 16. Tag jedoch vom Gewebe der Peyer'schen Platten, des Sacculus rotundus und des Appendix züchten. Auch in den Versuchen von NYIREDY et al. (1974) wurden Eintagsküken hohe Dosen verschiedener pathogener Aspergillen- und Penicillien-Stämme über längere Zeit in den Kropf eingebracht. Drei bis maximal zehn Tage nach Absetzen der Sporeneingabe ließen sich einige Stämme aus dem Verdauungsapparat vornehmlich aus dem Kropf kulturell nachweisen.

Pilzsporen sind im Magen-Darmtrakt dem physiologischen Vorgang der Persorption ausgesetzt.

Nach den zahlreichen Untersuchungen von VOLKHEIMER (1972) handelt es sich bei der Persorption ("Herbst-Effekt") um den mechanischen Durchtritt großer, fester, ungelöster Nahrungspartikel (Durchmesser bis

zu 150 u) aus dem Verdauungstrakt in den Organismus. Die Partikel gelangen auf rein mechanische Weise zwischen den Zellen der Epithelschicht hindurch in das Blut- und Lymphgefäßsystem von Mukosa und Submukosa. Von dort aus werden sie in den allgemeinen Blutkreislauf eingeschleust. Dies geschieht einmal auf dem chylösen Weg über den Ductus thoracicus, zum anderen auf dem venösen Weg über die Vena portae.

VOLKHEIMER konnte 3 - 6 Stunden nach Verfütterung von Lycopodium- und Steinpilzsporen an Hunden diese Partikel in der Blutbahn und im Urin nachweisen.

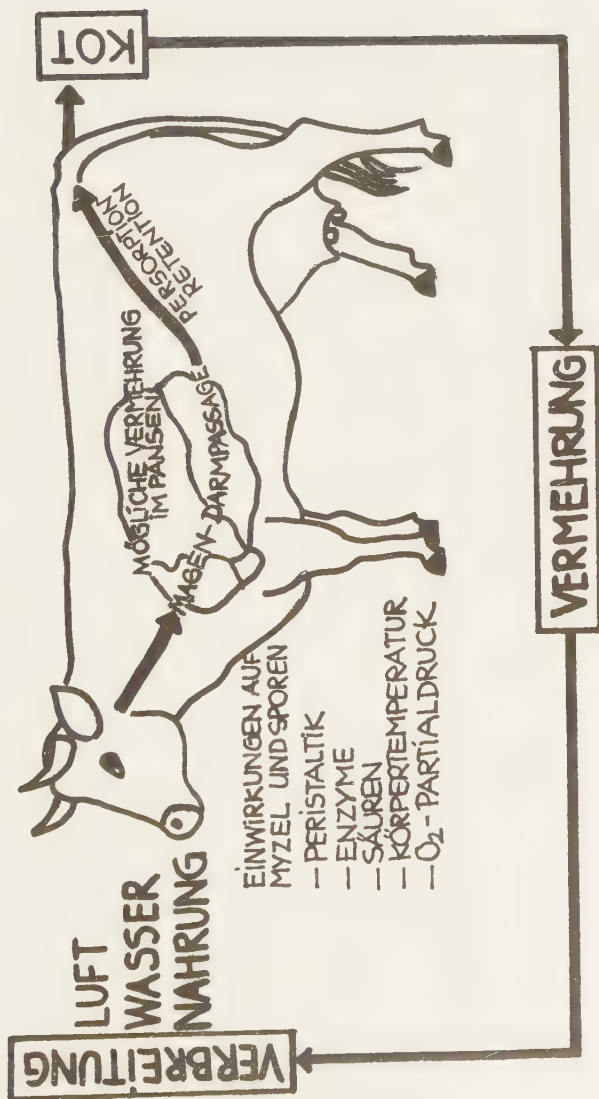
PETER (1966) wies nach massiver oraler Zufuhr von "fütterungsapathogenen" Schimmelpilzsporen diese parenteral innerhalb der ersten sechs Stunden nach.

Den Persorptionsmechanismus sieht RICHTER (1975) durch die Ergebnisse seiner Untersuchungen bestätigt. Er prüfte Sperma von Zuchtbullen und die jeweiligen Futtermittel unter anderem auf das Vorhandensein von Schimmelpilzen. Die in den Futtermitteln hauptsächlich vorhandenen Pilzarten traten auch überwiegend im Sperma auf.

VOLKHEIMER (1963) fand nach intravenöser Infusion verschiedener Modellkörper, unter anderem auch von Pilzsporen, zahlreiche Mikroembolien im pulmonalen Gefäßsystem. Er stellte in Langzeitversuchen fest, daß Partikel über Monate und Jahre im Lumen der Lungengefäße deponiert bleiben können. Er beobachtete sogar eine Ausscheidung von Partikeln aus dem Gefäßsystem am vorgelagerten Kaninchenmesenterium nach intraaortaler Infusion.

RICHTER (1975) diskutiert aufgrund seiner Ergebnisse in Anlehnung an VOLKHEIMER (1963) eine Verursachung von zeitlich begrenzten Mikroembolien durch Pilzsporen im Kapillargebiet des stark durchbluteten Hoden-Nebenhodenbereiches. Daraus sollen temporäre Störungen in der Spermiogenese resultieren.

ABB. 2 : LEBENSBEDINGUNGEN DER SCHIMMELPILZE IM TIERISCHEN ORGANISMUS



2.5 Mykotoxinbildung durch Schimmelpilze unter besonderer Berücksichtigung der Arten der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*

Ändern sich die Lebensbedingungen (Nährstoffangebot, Wachstumsfaktoren) der Schimmelpilze in größerem Maße, treten sekundäre Stoffwechselvorgänge in Kraft, die zur Bildung von Metaboliten führen, mit deren Hilfe sich der Organismus veränderten Lebensbedingungen anpaßt (BU LOCK, 1970). Bei diesen Metaboliten kann es sich um Toxine handeln (GEDEK, 1980 u.a.).

Nicht alle Stämme von potentiellen Toxinbildnern sind zur Toxinsynthese fähig. Außerdem kann ihr Toxinbildungsvermögen unter in vivo- oder in vitro-Bedingungen verschieden sein (GEDEK, 1969, 1970; ORTH, 1973).

Es handelt sich bei diesen Giftstoffen meist um relativ einfach aufgebaute, aliphatische oder zyklische organische Verbindungen mit einer geringen Anzahl von Kohlenstoffatomen und außerordentlich niedrigen Molekulargewichten (GEDEK, 1970).

Die Wirkung der Mykotoxine im Organismus, akut oder chronisch, ist sehr vielfältig: Schädigung der großen Parenchyme und der Blutbildungszentren, teratogene, karcinogene und neurotoxische Effekte, Beeinträchtigung der Sexual- und Reproduktionsfunktionen, sowie Immunsuppression, Reduzierung von Wachstum und Leistung.

Von den toxinbildenden Schimmelpilzen sind neben Vertretern aus den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* die Gattung *Fusarium* und Arten der Familie *Dematiaceae* anzuführen. Die *Fusarium*-Arten produzieren Zearalenon, sowie Trichothecene, wobei es sich um die einfachen Sesquiterpenoide wie T₂-Toxin, Nivalenol und Deoxynivalenol handelt, während letztere nur Trichothecene und zwar makrozyklische, wie Roridine bilden. Einen großen Anteil an der Bildung der chemischen Struktur nach weniger einheitlichen Verbindungen stellen die Vertreter der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*.

Aflatoxine, die bedeutendsten und am intensivsten erforschten Toxine, werden nur von *A.flavus* und *A.parasiticus* gebildet (ARAI et al., 1967).

Luteoskyrin wird von *Penicillium islandicum* produziert und zu den sogenannten "gelben Reistoxinen" gezählt.

Welche Aspergillen- und Penicillienarten vor allem im Getreide anzutreffen sind und welche sich von diesen unter natürlichen Bedingungen nach bisherigen Untersuchungen als Mykotoxinbildner erwiesen haben, gibt Tabelle 4 wieder.

Tabelle 4 : Hauptsächlich im Getreide anzutreffende Arten der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* (GEDEK, 1977a)

Gattung <i>Aspergillus</i>	Gattung <i>Penicillium</i>
<i>A.amstelodami</i> * <i>A.candidus</i> <i>A.chevalieri</i> * <i>A.flavus</i> <i>A.fumigatus</i> * <i>A.nidulans</i> <i>A.niger</i> <i>A.ochraceus</i> <i>A.repens</i> <i>A.ruber</i> * <i>A.terreus</i> * <i>A.versicolor</i>	<i>P.brevicompactum</i> <i>P.chrysogenum</i> * <i>P.corylophilum</i> * <i>P.cyclopium</i> * <i>P.expansum</i> <i>P.funiculosum</i> <i>P.oxalicum</i> * <i>P.puberulum</i> <i>P.roqueforti</i> <i>P.spinulosum</i> <i>P.stoloniferum</i> * <i>P.viridicatum</i>

* anerkannt als Bildner unter natürlichen Bedingungen nachgewiesener Mykotoxine

Diese und andere Arten dieser beiden Gattungen haben sich nach in vitro-Untersuchungen vor allem als Bildner der in Tab. 5 aufgeführten Mykotoxine erwiesen.

Tabelle 5: Aspergillus- und Penicillium-Arten als Bildner diverser Mykotoxine
(HESSELTINE, 1974; BAUER, 1976; BORKOWSKA, 1977; GEDEK, 1977b; BAUER und GEDEK,
1978a; POLONELLI et al., 1978; RU-DONG WEI und GAI XUONG LIN, 1978)

Ochratoxin A- Bildner	Sterigmatocyto- stidin- Bildner	Citrinin- Bildner	Patulin- Bildner	Penicillinsäure- Bildner
A. alliaceus A. melleus A. ochraceus A. petrakii A. sclerotiorum A. sulfureus P. commune P. palitans P. purpureus P. variabile P. verrucosum var. cyclopium P. verrucosum var. verrucosum P. viridicatum	A. flavus A. nidulans A. rugulosus A. ustus A. versicolor P. luteum	A. candidus A. niveus A. terreus P. canescens P. chraszczi P. citrinum P. citreo-sulfuratum P. citreo-viride P. claviforme P. expansum P. fellutanum P. implicatum P. jenseni P. lividum P. notatum P. palitans P. phaeo-janthinellum P. steckii P. velutinum P. viridicatum P. verrucosum var. cyclopium P. verrucosum var. verrucosum	A. clavatus A. giganteus A. terreus P. claviforme P. divergens P. equinum P. expansum P. granulatum P. leucopus P. melinii P. novae- zealandiae P. patulum P. thomii P. urticae	A. melleus A. ochraceus A. sulfureus A. quercinus P. baarnense P. madriti P. martensii P. mavoileus P. puberulum P. stoloniferum P. suavolens P. sulfureus P. thomii P. verrucosum var. cyclopium

Fortsetzung Tabelle 5.

Griseofulvin - Bildner	Kojisäure- Bildner
P.griseo-fulvum	A.flavus
P.patulum	A.oryzae
P.brefeldianum	A.candidus
P.albidum	A.nidulans
P.brunneo-stoloniferum	A.tamarii
P.janczewskii	A.albus
P.janthinellum	A.alliaceus
P.melenii	A.awamori
P.raistrickii	A.clavatus
P.raciborski	A.effesus
P.sclerotigenum	A.flavus
P.urticae	A.fumigatus
P.viridi-cyclopium	A.giganteus
	A.glaucus
	A.gymnosardae
	A.lutescens
	A.luteo-virescens
	A.parasiticus
	A.wentii
	P.daleae
	P.kojigenum
	P.lanosum
	P.rubrum

Rubratoxine- Bildner	Rugulosin- Bildner
P.rubrum	P.rugulosum
P.purpurogenum	P.bruneum
	P.tardum
	P.wortmanni
	P.variable

Fortsetzung Tabelle 5:

Gliotoxin- Bildner	Maltoryzin- Bildner
A.ochraceus A.fumigatus P.terlikowskii P.obscurum P.fenseni	A.oryzae var. microsporus

PR-Toxin- Bildner	Oxalsäure- Bildner
P.roqueforti	A.flavus A.niger

Eine eigene Gruppe bilden die sogenannten "neurotoxischen Mykotoxine". Nach LEISTNER et al. (1978a) sind bisher etwa 30 verschiedene bekannt, die von unterschiedlichen Pilzgattungen, u.a. Fusarium und Claviceps, vor allem aber auch von Aspergillus und Penicillium gebildet werden (MOREAU, 1979). Manche Arten zeigen diesen neurotoxischen Effekt zusätzlich zu anderen Toxinwirkungen im Organismus. Die bisher bekannten "neurotoxischen Mykotoxine" mit aufgeklärten Strukturen sind zusammen mit ihren Produzenten nach den Ausführungen von LEISTNER et al. (1978a) und nach Durchsicht der Literatur zusammengestellt (vgl. Tab. 6).

Tabelle 6: Zusammenstellung der "neurotoxischen Mykotoxine" und der dafür verantwortlichen Aspergillen- und Penicillienarten (nach LEISTNER et al., 1978a, ergänzt)

Mykotoxin: Spezies	Autoren	Mykotoxin: Spezies	Autoren
Aflatrem:		Fumitremorgen C:	
A.flavus	GALLAGHER u. WILSON (1978b)	A.fumigatus	COLE et al. (1977b)
Citreoviridin:		Oxalin:	
A.terreus	BAUER u. GEDEK (1978a)	P.oxalicum	NAGEL et al. (1974)
P.citrinum	LEISTNER et al. (1978b)	Paxillin:	
P.citreoviride	UENO (1974)	P.paxilli	COLE et al. (1977b)
P.micynskii	LEISTNER et al. (1978b)	Penitrem:	
P.ochrosal- moneum	UENO (1971)	P.canescens	SHREEVE et al. (1978)
P.pulvillorum	UENO (1974)	P.crustosum	WILSON et al. (1968) RICHARD u. ARP (1979)
Cyclopiazonsäure:		P.cyclopium	CIEGLER u. PITT (1970)
A.flavus	LUK et al. (1977) GALLAGHER et al. (1978a) BAUER u. GEDEK (1978a)	P.granulatum	CIEGLER u. PITT (1970)
A.versicolor	LUK et al. (1977)	P.martensii	LEISTNER (1977)
P.cyclopium	HOLZAPFEL (1968)	P.nigricans	MANTLE et al. (1978)
Fumitremorgen A:		P.palitans	CIEGLER (1969)
A.fumigatus	YAMAZAKI et al. (1971)	P.puperulum	LEISTNER (1977)
Fumitremorgen B:		Roquefortin:	
A.caespitosus	SCHROEDER et al. (1975)	P.roqueforti	SCOTT u. KENNEDY (1976) OHOMO (1977) ARNOLD (1978)
A.fumigatus	YAMAZAKI et al. (1971)	Territrem A:	
P.piscarium	GALLAGHER (1977)	Territrem B:	
		A.terreus	LING et al. (1979)

Fortsetzung Tabelle 6:

Mykotoxin: Spezies	Autoren	Mykotoxin: Spezies	Autoren
TR-2-Toxin:		Verruculogen:	
A.fumigatus	COLE et al. (1975)	A.caespitosus	SCHROEDER et al. (1975)
P.paraherquei	YOSHIZAWA (1976)	A.fumigatus	YAMAZAKI (1977)
P.verruculosum	COLE et al. (1975)	P.piscarium	GALLAGHER (1977)
		P.paraherquei	TAKUMI YOSHIZAWA et al. (1976)
Tryptoquivalin: Tryptoquivalon:		P.verruculosum	COLE et al. (1972) COLE u. KIRKSEY (1973) FAYOS et al. (1974)
A.clavatus	BUECHI et al. (1976)		
Brevianamid A, E		Verruculotoxin:	
P.brevicom- pactum	BIRCH und WRIGHT(1970)	P.verruculosum	COLE et al. (1975)

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß es eine Reihe weiterer Mykotoxine gibt, die sich aber überwiegend gegenüber Mikroorganismen als toxisch erwiesen haben und deshalb als toxische Antibiotika einzustufen sind.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Herkunft des Untersuchungsmaterials und Entnahme der Kotproben

In 36 landwirtschaftlichen Betrieben im oberbayerischen Raum nordwestlich und westlich von München wurden 114 Kotproben von Kühen rektal mit Einmalhandschuhen entnommen.¹

Die Probenentnahme erfolgte von Mitte April 1979 bis Ende Oktober 1979. In den ersten 3 Betrieben wurden jeweils 5 Kotproben gezogen. Nachdem die mykologische Untersuchung dieser Kotproben eine weitgehende Übereinstimmung in darin nachweisbaren Schimmelpilzen in Abhängigkeit vom Betrieb ergab, wurde die Anzahl der Proben pro Betrieb auf drei Tiere reduziert.

Der Fütterungsplan der Tiere wurde vom Betriebsleiter erfragt und von den hauptsächlich im Betrieb eingesetzten Futtermitteln Proben gezogen. In 32 Betrieben wurde somit je eine Futtermittelprobe gezogen, in 4 Betrieben je 2.

3.1.2 Anzüchtung der Schimmelpilze aus dem Untersuchungsmaterial und deren quantitative Erfassung

Zum Nachweis in Kot und Futtermitteln vorhandener lebensfähiger Schimmelpilze wurde das von GEDEK (1974) beschriebene Oberflächenverfahren herangezogen. Dazu wurden jeweils 10 g Kot bzw. 10 g Futtermittel abgewogen, in eine Schraubflasche mit 90 ml steriler Peptonlösung (siehe unten) überführt und 20 Minuten geschüttelt. Je nach Art des Futtermittels mußte dieses zuvor gegebenenfalls mittels Mörser bzw. Schere

¹ Herrn Dr. Mackeldey und Herrn Dr. Gerle danke ich für ihr Entgegenkommen, in ihrem Praxisgebiet Proben ziehen zu dürfen.

unter möglichst sterilen Bedingungen zerkleinert werden. Anschließend wurde von dieser Suspension eine Verdünnungsreihe 10^{-1} - 10^{-3} angelegt und jeweils 0,1 ml auf eine Sabouraud-Dextrose-Agarplatte und eine Pilzagarplatte nach SCHMIDT (siehe unten) ausgespatelt.

Nach einer Bebrütungszeit von 6-8 Tagen bei 20 - 22° C wurde die Gesamtpilzkeimzahl bestimmt. Neben den in erster Linie berücksichtigten Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* wurde auch das Vorkommen von *Mucoraceae*, *Dematiaceae*, *Fusarien*, sowie von Hefen registriert. Die im einzelnen hierzu verwendeten Medien waren wie folgt zusammengesetzt:

1. Peptonlösung:

1,2 g Pepton aus Fleisch (Merck Art. 7214)
10,2 g NaCl (Merck Art. 6404) ad 1200 ml Aqua dest.

2. Sabouraud-Dextrose-Agar

gemäß den Angaben der Fa. Merck (Art. 7315),
jedoch mit Zusatz von Penicillin (2×10^6 I.E./l) und
Streptomycin (200 mg/l) zur Hemmung des Bakterienwachstums.

3. Pilzagar nach SCHMIDT (pers. Mitteilung):

Malzextrakt (Oxoid Nr. L 39)	40,0 g/l
Hefeextrakt (Difco Nr. 0127-02)	2,0 g/l
Agar-Agar frei von Hemmstoffen (Difco Nr. 0140-01)	11 g/l
Marlophen 810 (Chem. Werke Hüls Nr. 437)	1,0 ml/l
Bengalrosa pH 6,0-6,2 (Fluka AG, Buchs Nr. 11950)	60 mg/l
Masarun ^R (Oxytetracyclin + Polymyxin B, Pfizer, Karlsruhe)	10 ml/l

Bei der Herstellung des Pilzagars nach SCHMIDT mußte Beachtung finden, daß die Bestandteile mit Ausnahme des Malzextraktes und des Masarun zunächst mit 1 Liter aqua dest. gelöst und autoklaviert wurden. Der Malzextrakt wurde daraufhin dem noch sterilen, heißen Medium zugegeben, der Antibiotikazusatz aber erst nach Abkühlen auf 45° C hinzugefügt.

3.1.3 Isolierung, Konservierung und Identifizierung der Aspergillen und Penicillien

Nach Gewinnung von Reinkulturen durch wiederholtes Überimpfen auf Sabouraud-Dextrose-Agarplatten wurden die aus dem Untersuchungsmaterial gezüchteten Aspergillen und Penicillien isoliert und konserviert.

Zum Zweck der Konservierung wurden die Stämme vorkultiviert auf Kartoffel-Dextrose-Agar (Merck Art. 10130), der hierzu nach Auflösung im Dampftopf in Reagenzgläser abgefüllt, mit Zellstoffstopfen verschlossen, 15 Minuten bei 121°C autoklaviert und danach bis zum Erstarren schräg gelegt wurde. Hatte sich während einer ungefähr 10tägigen Bebrütungszeit bei 20 - 22°C genügend fruktifizierendes Myzel gebildet, so wurde mit 5 ml sterilem Aqua dest. eine Sporensuspension hergestellt und diese nach Überführung in sterile Schraubverschlußgläschen bei +4°C aufbewahrt, wie dies MCGINNIS et al. (1974) empfehlen.

Die Identifizierung der einzelnen Stämme wurde aufgrund ihrer Makro- und Mikromorphologie unter Überprüfung der von ihnen jeweils gebildeten Fruktifikationsorgane im Vergleich mit bereits identifizierten Stämmen vorgenommen und dazu gegebenenfalls das Dünnschichtchromatogramm ihrer Stoffwechselprodukte nach Anreicherung in YES-Medium (siehe unten) herangezogen. 41 von insgesamt 155 nicht eindeutig zu charakterisierenden Stämmen wurden zur Identifizierung dem Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn (Niederlande) übersandt. Der Art *P. roqueforti* zuzuordnende Stämme wurden nach einer von ENGEL und TEUBER (1978) beschriebenen Methode bestimmt. Dazu wurde Kulturmateriel in Czapek Dox Liquid-Medium (Oxoid CM 95) überimpft, dem vor dem Autoklavieren 0,5 % Essigsäure zugesetzt worden war. Essigsäurefreies Czapek Dox Liquid-Medium diente als Kontrolle. Die Kulturen wurden 21 Tage bei 20 - 22°C bebrütet. Nur *P. roqueforti* vermag in Gegenwart von Essigsäure in Czapek Dox Liquid-Medium zu wachsen.

3.1.4 Anreicherung der toxischen Metaboliten der isolierten Schimmelpilze

Für die Untersuchung der isolierten Stämme auf ihr Toxinbildungsvermögen wurden diese in YES-Medium angereichert, welches mit einem Gehalt an 2 % YEAST-Extrakt (Difco Nr. 012702) und 15 % Saccharose (Merck Art. 7653) sich bereits bei Untersuchungen ähnlicher Art bewährte (DAVIS et al., 1966; VAN WALBEEK et al., 1968; SCOTT et al., 1972; WYATT, 1977; BAUER, 1976). Von diesem filtersterilisierten Nährmedium wurden jeweils 5 ml in sterile Reagenzgläser überführt, die Röhrchen jeweils mit 0,1 ml homogener Sporensuspension beimpft, und das Glas mit einem Zellstoffstopfen verschlossen. Mit jedem zu untersuchenden Stamm wurden 3 Röhrchen angesetzt und diese 21 Tage bei 20 - 22° C unter Lichtabschluß bebrütet.

3.1.5 Extraktion der in YES-Medium angereicherten Schimmelpilzkulturen

Nach 21 Tagen wurden die Schimmelpilzkulturen extrahiert (SCOTT et al., 1970). Dazu wurde der Inhalt der drei Reagenzgläser, bestehend aus Myzel, Sporen und Anreicherungsflüssigkeit, jeweils zunächst mit je einem ml Methanol (Merck Art. 6012) zur Sporenabtötung versetzt und anschließend mit 75 ml Chloroform in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, 30 Minuten geschüttelt und dann in einen Scheidetrichter filtriert. Die Chloroformphase wurde in einem Glaskolben aufgefangen und mittels eines Rotationsverdampfers vollkommen eingengt. Der so gewonnene Extrakt wurde in 5 ml Chloroform aufgenommen und in ein Schraubverschlußgläschen überführt. Nach Abdampfen des Chloroforms unter dem Abzug wurde der Extrakt bis zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung bzw. bis zur Überprüfung im Tierversuch bei +4° C aufbewahrt.

3.1.6 Verfahren der qualitativen Mykotoxinbestimmung

3.1.6.1 Dünnschichtchromatographie

Die gewonnenen Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch auf folgende Toxine untersucht: Aflatoxin B₁, Aflatoxin B₂, Aflatoxin G₁, Aflatoxin G₂, Ochratoxin A, Sterigmatocystin, Citreoviridin, Citrinin, Cyclopiazonsäure, Kojisäure, Penicillinsäure, Patulin, Griseofulvin, PR-Toxin, Verruculogen, Fumitremorgen B, Fumitremorgen C und TR-2-Toxin.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten (Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm) mit und ohne Fluoreszenzindikator (Merck Art. 5715 bzw. Merck Art. 5721) verwendet; zusätzlich wurden bei bestimmten Fragestellungen zur Trennung auch HPTLC-Platten (Merck Art. 5628) benutzt.

Die Rohextrakte wurden dazu in 1 ml Chloroform gelöst und davon jeweils 30 µl mittels einer Finnpiquette auf DC-Platten aufgetropft; auf HPTLC-Platten wurden nur 10 µl aufgetragen. Von den Toxinstandards, die als Vergleichssubstanzen dienten, wurden jeweils auch nur 10 µl aufgetropft. Entwickelt wurden die Platten zuerst eindimensional (Abb. 3) im Fließmittel TEF (Toluol:Essigsäureäthylester:Ameisensäure, 100:80:20; modif. nach SCOTT et al., 1970). Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht und unter UV-Licht (254 nm und 350 nm), wobei die Laufhöhe (Rf) und Farbe der einzelnen Punkte vor und nach dem Besprühen mit verschiedenen Reagenzien und, ggf. nach Erhitzung (Tab. 3), mit dem Verhalten der bekannten Toxinstandards verglichen wurde. Schien ein Extrakt Toxine aufzuweisen, so wurde zweidimensional mit und ohne "internen Standard" aufgetrennt (Abb. 4). Beim "internen Standard" wurde das vermutete Toxin zusammen mit dem Extrakt auf der gleichen Stelle aufgetropft und zweidimensional in zwei verschiedenen Fließmitteln aufgetrennt. In erster Laufrichtung erfolgte die Auftrennung im Fließmittel TEF (siehe oben), in der zweiten Laufrichtung im Fließmittel CAH (Chloroform:Hexan:Aceton, 142:33:25; Mitteilungen aus dem Bundesgesundheitsamt, 1975).

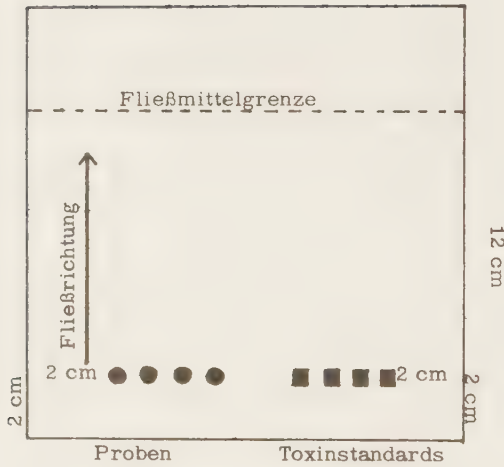


Abb. 3: Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

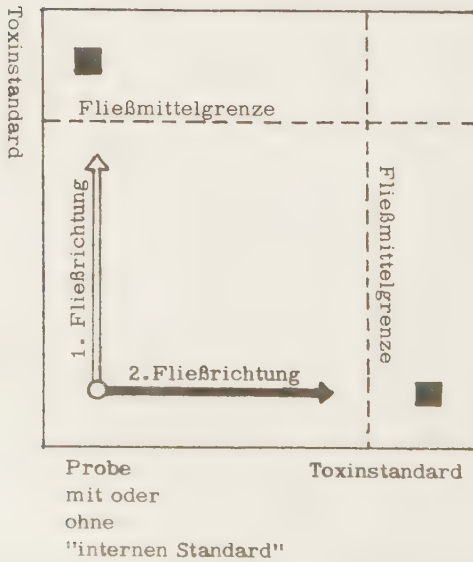


Abb. 4: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Wenn der bekannte Toxinstandard mit dem zu prüfenden Metaboliten eines Schimmelpilzes deckungsgleich übereinanderlag, wurden zur Bestätigung der Identität der Substanzen die Platten mit spezifischen Reagenzien besprüht, ggf. erhitzt und die Farbumschläge der sich entsprechenden Punkte bei Tages- und UV-Licht bewertet (Tab. 7).

Tabelle 7: Dünnschichtchromatographie ergänzende Nachweismethoden zur Darstellung und Identifizierung von Mykotoxinen (BAUER und GEDEK, 1978a - ergänzt)

Mykotoxin	Nachweismethode	Literatur
Aflatoxin B ₁	25 % Schwefelsäure-Spray* Trifluoressigsäure-Probe	Mitteilung aus dem Bundesgesundheitsamt, 1975 PRZYBYLSKI, 1975 STACK und POHLAND, 1975
Aflatoxin B ₂	25 % Schwefelsäure-Spray*	Mitteilung aus dem Bundesgesundheitsamt, 1975 STACK und POHLAND, 1975
Aflatoxin G ₁	25 % Schwefelsäure-Spray* Trifluoressigsäure-Probe	Mitteilung aus dem Bundesgesundheitsamt, 1975 PRZYBYLSKI, 1975 STACK und POHLAND, 1975
Aflatoxin G ₂	25 % Schwefelsäure-Spray*	Mitteilung aus dem Bundesgesundheitsamt, 1975 STACK und POHLAND, 1975
Ochratoxin A	p-Anisaldehyd-Spray* NH ₃ -Dämpfe	SCOTT et al., 1970 STACK und RODERICKS, 1971
Citreoviridin	Messung des UV-Absorptionsspektrums nach präparativer DC	UENO, Y. und UENO, I., 1972 ENGEL, 1977

* Mit anschließender Erhitzung bei 120° C, 10 - 20 Minuten

Fortsetzung Tabelle 7:

Mykotoxin	Nachweismethode	Literatur
Citrinin	p-Anisaldehyd-Spray [✱]	SCOTT et al., 1970
	25 % Schwefelsäure-Spray [✱]	LEISTNER, 1974
Cyclopiazonsäure	Ehrlich-Reagenz-Spray [✱]	HOLZAPFEL, 1971
Kojisäure	Eisen-III-Chlorid-Spray	WILSON, 1971
Penicillinsäure	p-Anisaldehyd-Spray [✱]	SCOTT et al., 1970
	NH ₃ -Dämpfe	CIEGLER und KURTZMAN, 1970
Patulin	MBTH ^{✱✱} -Spray [✱]	BAUMGARTNER et al., 1978
Griseofulvin	Messung des UV-Absorptionsspektrums nach präparativer DC	BRUNNER und MACHEK, 1965
PR-Toxin	25 % Schwefelsäure-Spray [✱]	RU-DONG WEI und GAI-XUONG LIU, 1978;
	Messung des UV-Absorptionsspektrums nach präparativer DC	RU-DONG WEI et al., 1978; POLONELLI et al., 1978; LEISTNER et al., 1978a
Verruculogen	AlCl ₃ -Spray [✱]	SCHROEDER et al., 1975
Fumitremorgen B	AlCl ₃ -Spray [✱]	SCHROEDER et al., 1975
Fumitremorgen C	AlCl ₃ -Spray [✱]	COLE et al., 1977b
TR-2-Toxin	AlCl ₃ -Spray [✱]	COLE et al., 1977b

✱ Mit anschließender Erhitzung bei 120° C, 10 - 20 Minuten

✱✱ Hydrazono-2,3-dihydro-3-methyl-benzothiazolhydrochlorid
(Merck Art. 4327)

Die Bestimmung von PR-Toxin und Griseofulvin erfolgte durch Messung des UV-Absorptionsspektrums nach präparativer Dünnschichtchromatographie. Dazu wurde ein Teil der fraglichen Extrakte mittels eines Chromatochargers linear auf DC-Platten aufgetragen und entwickelt. Anschließend wurde die fragliche Bande abgekratzt, mit Chloroform eluiert und mittels Rotationsverdampfer eingengt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, bis das Eluat dünn-schichtchromatographisch rein war. Nun wurde von dem Eluat das UV-Spektrum auf einem Beckmann Zweistrahl-Spektralphotometer, Modell DB, ermittelt und mit den bekannten Werten aus der Literatur verglichen.

3.1.6.2 Mäusetoxizitätstest

Dieser Versuch wurde in Anlehnung an Angaben von SAITO et al. (1971, 1974) und OHTSUBO et al. (1978) zum Nachweis von neurogenen Toxinen, für die vorerst keine Standards zur Verfügung stehen, durchgeführt und sollte zugleich die dünn-schichtchromatographische Untersuchung ergänzen. Als Versuchstiere dienten 18 - 20 g schwere, juvenile weibliche Mäuse (Stamm NMRI). Jedem Tier wurde 5,0 mg Rohextrakt, gelöst in 0,1 ml Dimethylsulfoxyd (DMSO), intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Je nach vorhandener Menge wurden die Extrakte an 2 oder 3 Tieren getestet. Stämme, von denen weniger als 10 mg Rohextrakt gewonnen wurde, kamen nicht zur Untersuchung. 3 Tieren wurde zur Kontrolle 0,1 ml DMSO i.p. verabreicht. Nach der Injektion erfolgte eine intensive Beobachtung der Tiere über 4 Stunden, anschließend wurde weitere 5 Tage lang das Verhalten der Mäuse täglich einmal registriert. Dabei wurde auf folgende Symptome besonders geachtet:

- keine Anzeichen besonderer klinischer Symptome
- Apathie mit anschließender Rekonvaleszenz oder darauffolgendem Tod des Tieres
- Tremor, Ataxien, Paralysen, Excitationen, ton. klon. Krämpfe mit anschließender Rekonvaleszenz oder darauffolgendem Tod des Tieres.

3.2 Ergebnisse und deren Besprechung

3.2.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchungen

3.2.1.1 Nachweisbarkeit von Schimmelpilzen in Rinderkot und deren Identifizierung

Bei der mykologischen Untersuchung der 114 Rinderkotproben waren aus jeder Probe Pilze züchtbar. Es stellte sich heraus, daß darunter am häufigsten Pilze der Familie Mucoraceae anzutreffen waren; 110 Proben wiesen diese niederen Pilze auf. Vertreter der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* waren in 29 bzw. 77 Proben zu finden, während *Dematiaceen* in 32 Proben und *Fusarien* in 23 Proben nachzuweisen waren. Hefen konnten in 92 Kotproben gefunden werden.

Die Bestimmung der Schimmelpilzkeimzahlen der Kotproben ergab für 49 Proben einen Keimgehalt von $>10^3$ - $<10^4$ /g und für 39 Proben einen Keimgehalt von $>10^4$ - $<10^5$ /g. Keimzahlen unter 10^3 /g waren in 21 Proben anzutreffen, während nur 5 Proben einen Keimgehalt über 10^5 /g aufwiesen (vgl. Abb. 5).

Die Ergebnisse der Differenzierung der isolierten *Aspergillen* und *Penicillien* werden der besseren Übersicht wegen tabellarisch (s. Tab. 8) wiedergegeben. Es geht daraus hervor, daß 35 Stämme der Gattung *Aspergillus* und 98 Stämme der Gattung *Penicillium* zuzuordnen waren. *A.fumigatus*, *A.repens* und *A.flavus* waren die am häufigsten nachzuweisenden *Aspergillus*-Arten, während unter den *Penicillien* *P.verrucosum* var. *cyclopium*, *P.verrucosum* var. *melanochlorum* und *P.roqueforti* dominierten.

3.2.1.2 Keimbefall der in den Betrieben der Kotentnahme gezogenen Futtermittelproben

Bei den ergänzend auf den Befall mit Schimmelpilzen untersuchten Futtermitteln, von denen insgesamt 40 Proben in den 36 Betrieben der Kotentnahme, in der Hauptsache jeweils von dem vornehmlich zur Verfütterung gelangten Futtermittel gezogen worden waren, handelte es sich in erster Linie um Grünfutter (22 Proben) und des weiteren um Heu (9 Proben),

Anzahl der Kot- und
Futtermittelproben

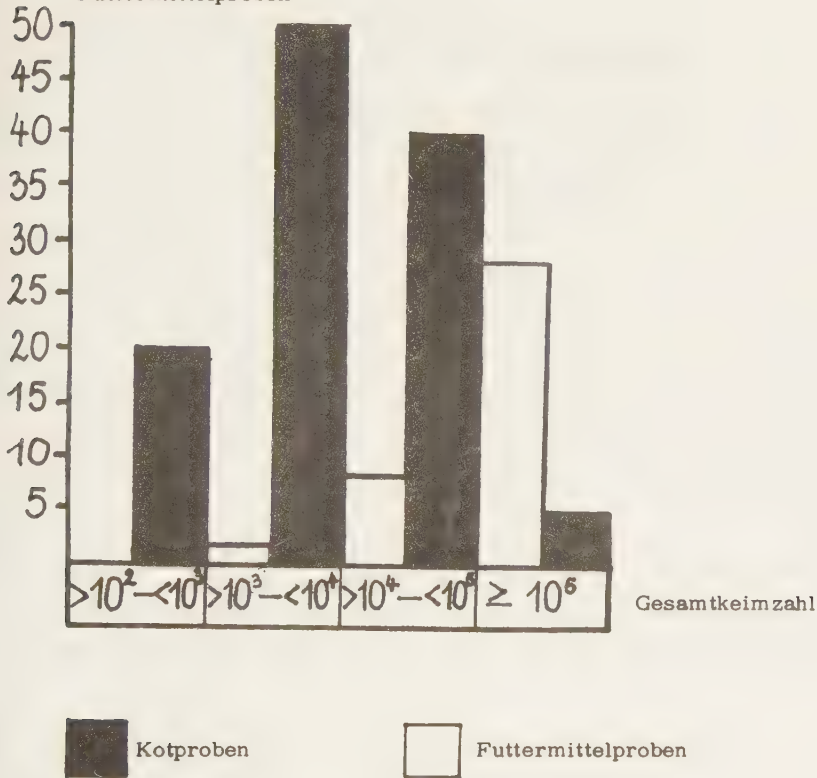


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der bei der Untersuchung von 114 Kotproben und 40 Futtermittelproben im einzelnen festgestellten Schimmelpilzkeimzahlen/g Kot bzw. /g Futtermittel.

Kraftfutter (5 Proben) und Silage (4 Proben).

Wie bei der mykologischen Untersuchung des Kotes der Tiere waren auch bei der Bestimmung des Keimgehaltes der Futtermittel aus jeder Probe Pilze züchtbar. 36 Proben wiesen *Mucoraceae*, 33 Proben *Dematiaceae* und 20 Proben *Fusarien* auf. Vertreter der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* waren diesen gegenüber unterrepräsentiert, denn nur in 8 bzw. 7 Proben waren sie nachweisbar. Auch Hefen waren häufiger anzutreffen, da sie in

38 Proben festgestellt werden konnten.

Die Bestimmung der Schimmelpilzkeimzahlen ergab für Heu und Kraftfutter nur in 9 Fällen einen Keimgehalt $>10^5/\text{g}$. 4 Proben wiesen einen Keimgehalt von $>10^4/\text{g}$ - $<10^5/\text{g}$ und 2 Proben einen Keimgehalt von $>10^3$ - $<10^4/\text{g}$ Futter auf. Der Keimgehalt des Grünfutters lag dagegen bei 19 Proben über $10^5/\text{g}$ und nur bei 3 Proben zwischen $10^4/\text{g}$ und $10^5/\text{g}$. Bei den 4 Silageproben war 3 mal ein starker Hefebesatz zu verzeichnen. Nur eine dieser Proben wies zusätzlich Schimmelpilze in Keimzahlen von $1,6 \times 10^4/\text{g}$ auf. Über die Häufigkeit der von Futtermittelproben insgesamt ermittelten Schimmelpilzkeimzahlen informiert im Vergleich zu den bei quantitativen Untersuchungen des Kotes der Tiere festgestellten Werten Abb. 5.

Welchen Arten die aus den Futtermitteln isolierten 7 Stämme von *Aspergillen* und 15 Stämme von *Penicillien* angehörten, geht aus Tab. 8 hervor, in denen auch die aus Kot isolierten und identifizierten Stämme aufgeführt sind.

Dieser Tabelle (Tab. 8) kann entnommen werden, daß aus diesem Untersuchungsmaterial am häufigsten *Aspergillus repens* und *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* züchtbar waren. Die 18 Stämme der 3 nachgewiesenen *Aspergillus*-Arten und der 6 *Penicillium*-Arten waren aus Heu bzw. Kraftfutter isoliert worden. In 2 Grünfutterproben war *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* anzutreffen. Von den 2 Stämmen *P. roqueforti* war je einer aus Silage und Heu nachgewiesen worden.

3.2.2 Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchungen

3.2.2.1 Bestimmung definierter Toxine in Kulturextrakten der isolierten Schimmelpilzstämme mittels Dünnschichtchromatographie

Von 133 getesteten Stämmen aus Rinderkot erwiesen sich 72 (= 54 %) als Bildner eines oder mehrerer Mykotoxine. Bei den *Penicillien* zeigten 52 von 98 (= 53 %) Stämmen solche Eigenschaften, während 20 von 35 *Aspergillen* (= 57 %) als Toxinbildner erkannt werden konnten.

Tabelle 8: Systematische Zugehörigkeit der 155 aus Kot und Futtermitteln isolierten Schimmelpilzstämmen

Arten der Gattung Aspergillus (A) und Penicillium (P)	Anzahl der aus Kot isolierten Stämme	Anzahl der aus Futtermitteln isol. Stämme
A.amstelodami	1	
A.candidus	1	
A.flavus	8	2
A.fumigatus	12	1
A.nidulans	3	
A.repens	10	4
insgesamt	35	7
P.brevicompactum	9	
P.chrysogenum	9	1
P.decumbens	1	
P.expansum	1	
P.frequentans	1	1
P.griseofulvum	6	
P.nigricans	1	
P.paraherquei	1	
P.roqueforti	32	2
P.verrucosum var. cyclopium	21	8
P.verrucosum var. melanochlorum	16	2
P.verrucosum var. verrucosum		1
insgesamt	98	15
in toto	133	22

Alle 12 isolierten *A.fumigatus*-Stämme bildeten mehrere neurotoxische Metaboliten: 6 Stämme produzierten Fumitremorgen B, Fumitremorgen C, TR-2-Toxin und Verruculogen, während in Extrakten von 6 weiteren Stämmen nur Fumitremorgen C und TR-2-Toxin nachweisbar waren.

Ebenso konnten bei allen 8 *A.flavus*-Stämmen toxische Stoffwechselprodukte festgestellt werden; jeder Stamm bildete Kojisäure, während ein Stamm zusätzlich auch noch Cyclopiazonsäure produzierte. Bei den Stämmen von *A.repens*, *A.nidulans*, *A.amstelodami* und *A.candidus* konnte dünnschichtchromatographisch keines der gesuchten Mykotoxine nachgewiesen werden.

Von den durch Pilze der Gattung *Penicillium* produzierten Toxinen war PR-Toxin am häufigsten nachzuweisen. In jedem der von 32 Stämmen gewonnenen Extrakte war dieses Mykotoxin nachweisbar. Ebenso erwies sich jeder der 6 *P.griseofulvum*-Stämme als Bildner von Griseofulvin und Patulin. Als weitere Griseofulvinbildner konnten ein Stamm von 9 *P.brevicompactum*-Stämmen und ein Vertreter der Art *P.nigricans* erkannt werden.

Penicillinsäure konnte in 11 Extrakten dünnschichtchromatographisch bestimmt werden. 9 Bildner dieses Toxins gehörten der Art *P.verrucosum* var. *cyclopium* (21 Isolate), einer der Art *P.verrucosum* var. *melanochlorum* (16 Isolate) und ein weiterer der Art *P.paraherquei* (1 Isolat) an. Citrinin konnte nur in einem Extrakt festgestellt werden, der von einer *P.expansum*-Kultur stammte. Extrakte von *P.chrysogenum*, *P.decumbens* und *P.frequentans* wiesen keine bestimmbar Mykotoxine auf.

Nach dem Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Extrakte der 22 aus Futtermitteln isolierten Stämme befanden sich darunter 7 Bildner einer oder mehrerer Mykotoxine und zwar 3 Stämme der Gattung *Aspergillus* sowie 4 Stämme der Gattung *Penicillium*.

Die 2 *A.flavus*-Stämme, die aus Heu isoliert worden waren, bildeten

Tabelle 9: Bildung bekannter Mykotoxine durch 133 aus Rinderkot isolierte Stämme der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*

Mykotoxin	Anzahl toxin- bildender Stämme [*]		Artzugehörigkeit ^{**}
PR-Toxin	32	(24 %)	<i>P.roqueforti</i>
Fumitremorgen C	12	(9 %)	<i>A.fumigatus</i>
TR-2-Toxin	12	(9 %)	<i>A.fumigatus</i>
Penicillinsäure	11	(8 %)	<i>P.verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (9) <i>P.verrucosum</i> var. <i>melanochlorum</i> (1) <i>P.paraherquei</i> (1)
Kojisäure	8	(6 %)	<i>A.flavus</i>
Griseofulvin	8	(6 %)	<i>P.griseofulvum</i> (6) <i>P.brevicompactum</i> (1) <i>P.nigricans</i> (1)
Fumitremorgen B	6	(5 %)	<i>A.fumigatus</i>
Verruculogen	6	(5 %)	<i>A.fumigatus</i>
Patulin	6	(5 %)	<i>P.griseofulvum</i>
Citrinin	1	(1 %)	<i>P.expansum</i>
Cyclopiazonsäure	1	(1 %)	<i>A.flavus</i>

* Einige Stämme bildeten mehrere Toxine gleichzeitig

** In Klammern jeweils Anzahl toxinbildender Stämme

Kojisäure. Ein Stamm (ebenfalls aus Heu) von den beiden der Varietät *melanochlorum* von *P.verrucosum* zuzuordnenden Stämmen produzierte Penicillinsäure, während sich der Vertreter von *P.verrucosum* var. *verrucosum* als Citrinin- und Ochratoxin A-Bildner erwies. Ein wiederum aus Heu isolierter *A.fumigatus*-Stamm produzierte Fumitremorgen C und TR-2-Toxin; die beiden Stämme von *P.roqueforti* aus Heu und Silage wa-

ren dagegen befähigt, PR-Toxin zu bilden. Extrakte von *A.repens*, *A.frequentans*, *P.verrucosum* var. *cyclopium* und *P.chrysogenum* lediglich wiesen keine durch Dünnschichtchromatographie bestimmbaren Mykotoxine auf.

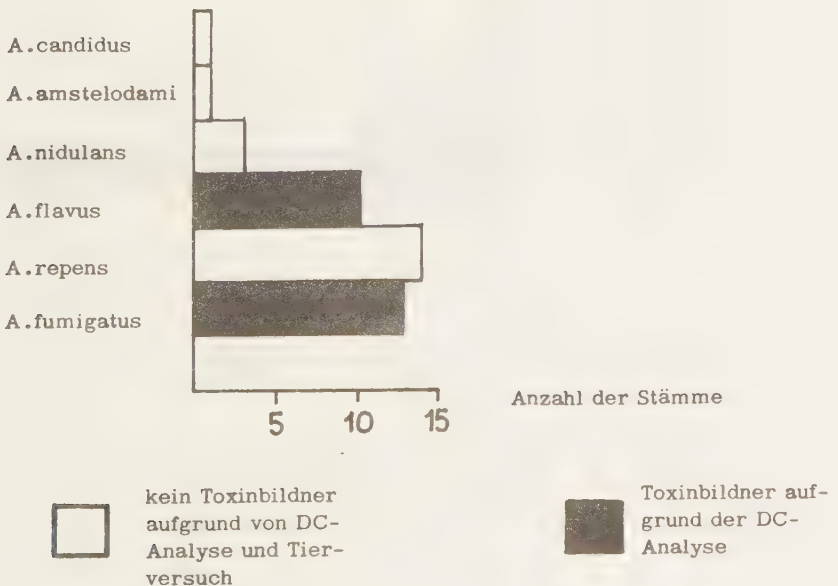
3.2.2.2 Überprüfung des Toxinbildungsvermögens der in YES-Medium angereicherten Schimmelpilzstämme im Mäusetoxizitätstest

Von den 155 aus Kot und Futtermitteln isolierten Stämmen wurden 120 im Tierversuch getestet, da aus den Kulturen mehr als 10 mg Rohextrakt gewonnen werden konnte. 31 dieser Extrakte erwiesen sich nach dem Ergebnis dieser Prüfung für die Maus als toxisch. Apathie mit darauf folgendem Tod von 1-2 bzw. 1-3 Tieren (vgl. 3.1.6.2) trat nach der Injektion von 18 Extrakten innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 5 Tagen ein. Davon stammten 6 Extrakte von *P.griseofulvum*, 5 Extrakte von *P.verrucosum* var. *cyclopium*, 2 Extrakte von *P.roqueforti* und je ein Extrakt von *P.brevicompactum*, *P. paraherquei*, *P.frequentans*, *P.chrysogenum* und *P.expansum*. Tremor mit anschließendem Tod von 1-2 oder 1-3 Tieren ließ sich nach der Injektion von 11 Extrakten beobachten. Es handelt sich dabei um 8 *A.fumigatus*-Extrakte und je 1 Extrakt der Penicillien *P.verrucosum* var. *cyclopium*, *P.verrucosum* var. *melanochlorum* und *P.chrysogenum*.

In 26 der 31 Extrakte, bei denen der Mäusetoxizitätstest ein positives Resultat lieferte, hatten sich eines oder mehrere Toxine dünnschichtchromatographisch nachweisen lassen (vgl. Tab. 10), lediglich bei 5 Extrakten war dies nicht möglich.

Der dünnschichtchromatographische Nachweis von tremorgenen Toxinen bei allen 9 getesteten *A.fumigatus*-Stämmen wurde im Tierversuch bestätigt. Die tremorgene Wirkung trat bei allen Tieren sehr schnell ein. Die Mehrzahl der Versuchstiere starb innerhalb von 2 Stunden nach der Injektion, nur in zwei Gruppen überlebten alle Tiere. Es spricht dies dafür, daß der Mäusetoxizitätstest insbesondere für den Nachweis derartiger Toxine geeignet ist. Tremorgene Effekte ließen sich außerdem nach

Injektion des Extraktes eines Penicillinsäure-bildenden Stammes der 28 von *P. verrucosum* var. *cyclopium* getesteten Stämme beobachten, während bei einem zweiten, nach dem DC-Gramm nichttoxinbildenden Stamm die Tiere innerhalb einer Stunde, nachdem sie Erscheinungen von Tremor gezeigt hatten, starben. Mit dem Extrakt eines ebenfalls Penicillinsäure-bildenden Stammes von 13 untersuchten *P. verrucosum* var. *melanochlorum*-Stämmen starben 2 von 3 Versuchstieren unter entsprechenden, für eine tremorgene Wirkung typischen Symptomen innerhalb von 8 Stunden nach der Injektion.



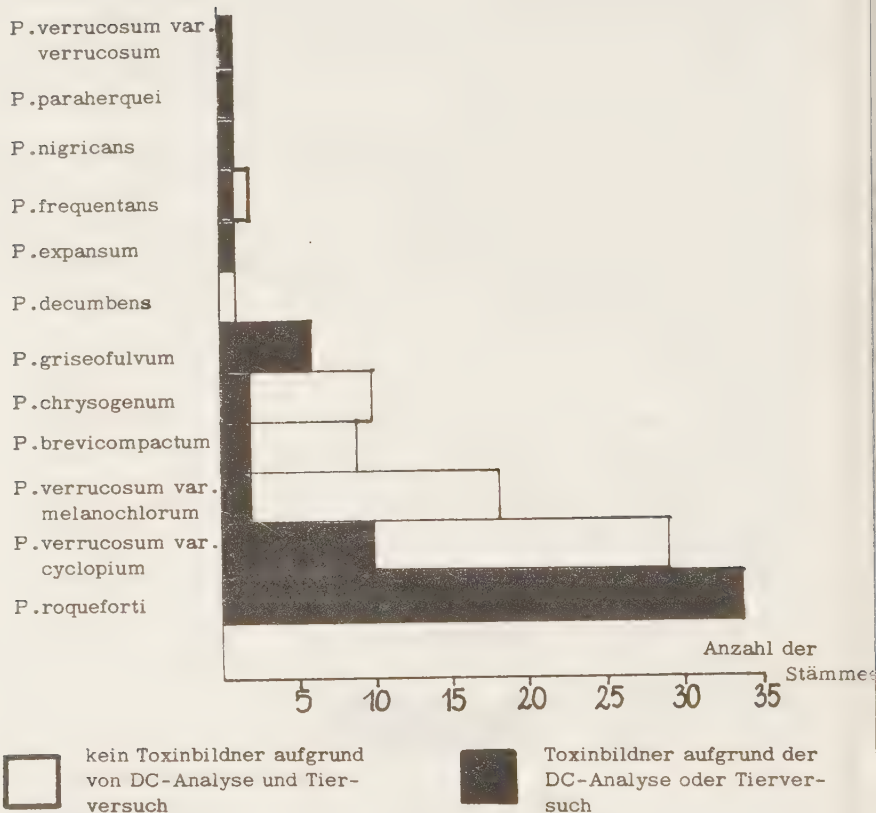


Abb. 7: Gegenüberstellung der toxinogenen und atoxinogenen Stämme der Gattung *Penicillium* unter Berücksichtigung der Artzugehörigkeit.

Die toxischen Effekte aller 6 getesteten *P. griseofulvum*-Stämme, deren Extrakte stets Griseofulvin und Patulin aufgewiesen hatten, waren gleichfalls als stark zu bezeichnen. Die Tiere zeigten Apathie und starben fast alle bereits innerhalb von 5 Stunden. Die letale Wirkung dürfte vom Patulin ausgegangen sein, dessen LD₅₀ für Mäuse bei intravenöser Injektion mit 0,3 - 0,7 mg/20 g Körpergewicht im Vergleich zu anderen

Mykotoxinen relativ niedrig liegt (CIEGLER et al., 1971). Die dünn-schichtchromatographische Auswertung der Extrakte von *P.griseofulvum* ließ außerdem auf eine sehr hohe Rate der Bildung von Patulin schließen. Bei 5 der getesteten *P.verrucosum* var. *cyclopium*-Stämme, die nach dem DC-Gramm Penicillinsäure gebildet hatten, ergab der Tierversuch Apathie mit anschließendem Tod der Mehrzahl der Tiere innerhalb von 48 Stunden. In einer Testgruppe traten auch deutlich Erscheinungen von Ataxie auf. Gleichfalls Apathie mit anschließendem Tod fast aller Tiere war auch nach Injektion der Extrakte des Penicillinsäure-Bildners *P.paraherquei*, des Citrinin-Bildners *P.expansum* und zweier der 14 untersuchten *P.roqueforti*-Stämme, die auch PR-Toxin bildeten, zu beobachten.

Außer mit dem Extrakt von *P.verrucosum* var. *cyclopium* (siehe oben) war mit weiteren 4 Extrakten eine Toxinwirkung im Tierversuch zu erkennen, ohne daß eines der gesuchten Toxine dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei im einzelnen um Extrakte eines der 8 getesteten Stämme von *P.brevicompactum*, um 2 von 9 getesteten *P.chrysogenum*-Stämmen und um einen der 2 dem Test unterzogenen *P.frequentans*-Stämme. Obwohl mittels Dünnschichtchromatographie verschiedentlich in den Extrakten noch Toxine nachgewiesen worden waren, lieferte der Mäusetoxizitätstest in diesen Fällen ein negatives Resultat. Diese Tatsache kann auf die unterschiedliche Empfänglichkeit der Maus gegenüber den verschiedenen Mykotoxinen zurückzuführen sein, oder aber auch darauf beruhen, daß die in den Extrakten vorliegenden Toxinmengen allgemein sehr gering waren, so daß deshalb kein präzises Testergebnis erhalten wurde.

Die Tabelle 10 gibt zu den Versuchsergebnissen nähere Erläuterungen. Die Abbildungen 6 und 7 bringen die Untersuchungsergebnisse der bei dem Mykotoxinnachweis angewandten Verfahren zur Veranschaulichung.

Tabelle 10.: Gegenüberstellung der Ergebnisse des Mäusetoxizitätstests und des Nachweises von Mykotoxinen mittels Dünnschichtchromatographie

Artzugehörigkeit der geprüften Stämme	Herkunft* und Anzahl der Stämme	davon nach DC-Gramm toxinbildend	nachgewiesene Toxine	Prüfung der Extrakte im Mäusetoxizi- tätstest		
				verendete Tiere mit Tre- mor	ohne Tre- mor	überlebende Tiere ohne klin. Symptome
<i>A.fumigatus</i>	K 8 F 1	9	Fumitremorgen B + C TR-2-Toxin Verruculogen	10/17	6/6	
<i>A.flavus</i>	K 8 F 2	10	Kojisäure Cyclopiazon- säure			29/29
<i>A.repens</i>	K 10 F 4	-	-			42/42
<i>A.nidulans</i>	K 2	-	-			5/5
<i>A.amstelodami</i>	K 1	-	-			3/3
<i>P.griseofulvum</i>	K 6	6	Griseofulvin Patulin	15/18		
<i>P.brevicompactum</i>	K 8	1	Griseofulvin	<u>3/3</u> ^{***}		21/21
<i>P.nigricans</i>	K 1	1	Griseofulvin			3/3
<i>P.verrucosum</i> var. cycloptium	K 21 F 7	9	Penicillinsäure	<u>3/3</u>	13/15	58/58
<i>P.verrucosum</i> var. melanochlorum	K 11 F 2	2	Penicillinsäure	<u>2/3</u>		39/39

Fortsetzung Tabelle 10:

Artzugehörigkeit der geprüften Stämme	Herkunft* und Anzahl der Stämme	davon nach DC-Gramm toxinbildend	nachgewiesene Toxine	Prüfung der Extrakte im Mäusetoxizitätstest			
				verwendete Tiere mit Tre- mor	ohne Tre- mor	überlebende Tiere mit Tre- mor	ohne klin. Symptome
P. paraherquei	K 1	1	Penicillinsäure		3/3		
P. roqueforti	K 13 F 1	14	PR-Toxin		2/5		26/26
P. expansum	K 1	1	Citrinin		3/3		
P. chrysogenum	K 8 F 1	-	-	1/2 ⁺⁺	2/3		
P. frequentans	K 1 F 1	-	-		2/3		3/3
P. decumbens	K 1	-	-				3/3

*K = Kot

F = Futtermittel

** Unterstrichene Testergebnisse: Keine Toxinbildung der Extrakte im DC-Gramm nachgewiesen

4. DISKUSSION

Die Nachweisbarkeit von Schimmelpilzen in mehr oder weniger hohen Keimzahlen/g Faeces in allen Proben der 114 Rinder aus 36 Betrieben kann dahingehend ausgelegt werden, daß zumindest ihre Sporen noch nach der Magen-Darmpassage keimfähig sind. Die Befunde stehen damit in Einklang mit den früheren Beobachtungen durch ROLLE und KOLB (1954) sowie SEELIGER und GEDEK (1967) und den neueren Feststellungen von JOHNSON und PREECE (1979), vgl. hierzu auch 2.4.4.

Nach dem Ergebnis der vergleichend durchgeführten Futtermitteluntersuchungen, bei denen sehr häufig Keimzahlen von $>10^5$ /g Futter zu ermitteln waren, wären eigentlich in den Faeces höhere Keimzahlen zu erwarten, denn nicht nur durch den Entzug der Nährstoffe, sondern auch durch die starke Wasserresorption im Darm wird die ursprüngliche Nahrung erheblich eingedickt. Aufgrund dieser Tatsache ist anzunehmen, daß zumindest ein Teil der mit dem Futter aufgenommenen Schimmelpilze entweder während der Magen-Darmpassage verdaut wurde oder die Lebensfähigkeit einbüßte, wie dies von manchen Hefen beschrieben ist (GEDEK, 1980). Nicht in jedem Fall werden die Schimmelpilze, die stets Myzel bilden, nur als Sporen mit der Nahrung aufgenommen. Falls die Myzelien, aber nicht die Sporen verdaut werden, könnte damit die Diskrepanz zwischen Befunden der quantitativen Analyse von Kot und Futtermittel erklärt werden, denn die Keimzahlen werden aufgrund der jeweils feststellbaren koloniebildenden Einheiten/g ermittelt und sind deshalb nicht als repräsentativ für jeweilige Zahlen an Sporen in einem Untersuchungsmaterial anzusehen.

Bei Berücksichtigung der im Kot der Tiere und in den Futtermitteln nachweisbaren Arten der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, waren von wenigen Ausnahmen abgesehen, die wiederholt aus Rinderkot isolierten Spezies auch in den vergleichend dazu untersuchten Futtermitteln festzu-

stellen (vgl. Tab. 8). Nach der Aufstellung in Tab. 11 waren in Betrieben, in denen hauptsächlich Heu oder Grünfutter verabreicht worden war, in etwa die gleichen Spezies dominant. Wurde zusätzlich zum Grünfutter oder vornehmlich Silage im Betrieb eingesetzt, war *Penicillium roqueforti* gemäß seinem häufigeren Vorkommen im Gärfutter als in anderen Futtermitteln auch in den Faeces der damit gefütterten Rinder regelmäßig nachweisbar. Da *P. verrucosum* var. *cyclopium* (17 Nachweise) gegenüber *P. roqueforti* (15 Nachweise) bei vorwiegender Grünfuttermittelverabreichung dominierte und *P. verrucosum* var. *melanochlorum* (14 Nachweise) daneben relativ häufig nachweisbar war, berechtigt das zu der Annahme, daß eine Korrelation zwischen den in den Futtermitteln vorkommenden Arten und deren Nachweisbarkeit in den Faeces der Tiere besteht. Handelte es sich in erster Linie um Heu bei den im Betrieb verabreichten Futtermitteln, ergab sich, wie aus Tab. 11 hervorgeht, die größte Vielfalt der aus den Faeces isolierten Arten, was abermals den Zusammenhang zwischen Fütterung und Ausscheidung lebensfähiger Aspergillen und Penicillien unterstreicht. Obwohl Futtermittelproben aus den verschiedenen Betrieben nur stichprobenartig untersucht worden waren, ergab sich bei 3 Betrieben eine Übereinstimmung insofern, als hierbei sowohl die Futtermittel als auch die Faeces der untersuchten Tiere keine Aspergillen oder Penicillien aufwiesen. Schließlich läßt sich aus den Untersuchungsbefunden sogar eine Saisonabhängigkeit im Nachweis bestimmter Arten ableiten: Die im Mai - Juni gezogenen Proben wiesen gemäß der Reste-Verfütterung von Silage häufiger *P. roqueforti* auf; ab September wurde auch *A. flavus* nachgewiesen. Ab Oktober waren von den Feldpilzen die Fusarien festzustellen. Daneben traten dann auch die als Lagerungspilze geltenden Arten auf, die dafür bekannt sind, daß sie nach BAUER (1976), GEDEK (1977) und BAUER und GEDEK (1978a) in Cerealien anzutreffen sind. Diese Ergebnisse bestätigen zugleich, was die Silage anbetrifft, die von LE BARS und ESCOULA (1973) sowie von PELHATE (1977a) vorliegenden Befunde und decken sich mit den Angaben bezüglich der anderen Futtermittel von SCHMIDT (1975), welcher auch

Tabelle 11: Aufschlüsselung der Ergebnisse der in Rinderkot nachweisbaren *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten unter Berücksichtigung der in den jeweiligen Betrieben eingesetzten Futtermittel

Vorwiegende Fütterung** (sonstige Futtermittel)	Anzahl der Betriebe/ Kühe	In den Faeces nachgewiesene Arten	Anzahl der isolierten Stämme
Silage (H, G bzw. H, K)	5/21	<i>A.fumigatus</i> <i>A.nidulans</i> <i>A.repens</i> * <i>P.chrysogenum</i> <i>P.griseofulvum</i> <i>P.roqueforti</i> * <i>P.versucosum</i> var. <i>cyclopium</i> * <i>P.versucosum</i> var. <i>melanochlorum</i> *	4 1 2 1 1 17 3 1
Grünfütter (K)	15/45	<i>A.candidus</i> <i>A.flavus</i> <i>A.fumigatus</i> <i>A.nidulans</i> <i>A.repens</i> * <i>P.brevicompactum</i> <i>P.chrysogenum</i> <i>P.decumbens</i> <i>P.frequentans</i> <i>P.griseofulvum</i> <i>P.paraherquei</i> <i>P.roqueforti</i> <i>P.versucosum</i> var. <i>cyclopium</i> * <i>P.versucosum</i> var. <i>melanochlorum</i> *	1 2 5 1 7 1 4 1 1 3 1 5 8 9

Fortsetzung Tabelle 11:

Vorwiegende Fütterung** (sonstige Futtermittel)	Anzahl der Betriebe/ Kühe	In den Faeces nachgewiesene Arten	Anzahl der isolierten Stämme
Grünfütter (H,K bzw. S,K bzw. S,H,K)	14/42	<i>A.flavus</i> * <i>A.fumigatus</i> * <i>P.brevicompactum</i> <i>P.chrysogenum</i> * <i>P.expansum</i> <i>P.griseofulvum</i> <i>P.nigricans</i> <i>P.roqueforti</i> * <i>P.verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> * <i>P.verrucosum</i> var. <i>melanochlorum</i> *	4 2 8 3 1 2 1 10 9 5
Heu (G bzw. K)	2/6	<i>A.amstelodami</i> <i>A.flavus</i> <i>A.fumigatus</i> <i>A.nidulans</i> <i>A.repens</i> <i>P.chrysogenum</i> <i>P.verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> <i>P.verrucosum</i> var. <i>melanochlorum</i>	1 2 1 1 1 1 1 1

* im Futter nachgewiesen

**S = Silage (überw. Mais)

G = Grünfütter

H = Heu

K = Kraftfütter

auf saisonale Abhängigkeit des Auftretens höherer Keimzahlen, im Herbst erntebedingt und im Frühjahr lagerungsbedingt, von Schimmelpilzen hinweist.

Unter dem Aspekt, welche der in Kot und Futtermittel nachgewiesenen Arten sich zugleich ihrem Toxinbildungsvermögen nach identisch erwiesen haben, läßt sich folgendes anführen. Wenn die Stämme sowohl mittels Dünnschichtchromatographie als auch im Tierversuch überprüft worden waren, wurden, mit Ausnahme des *P. verrucosum* var. *cyclopium* aus 3 Betrieben, erstaunlich übereinstimmende Resultate erhalten. Dies macht abermals die enge Beziehung zwischen den mit dem Futter aufgenommenen Schimmelpilzen und ihrem Auftreten im Kot deutlich. Waren doch in 6 Betrieben die artgleichen Stämme, unabhängig ob sie aus dem Kot oder aus den Futtermitteln isoliert worden waren, stets übereinstimmend keine Toxinbildner. Nach dem Ergebnis der mykotoxikologischen Untersuchung erwiesen sich immerhin die Stämme aus Kot mittels Dünnschichtchromatographie zu zwei Drittel als toxinbildend. Dieser Tatbestand verdient Beachtung, auch wenn die Befunde in Bezug auf ihr Toxinbildungsvermögen im Tierversuch negativ lauteten. Ferner kann dazu ausgeführt werden, daß in 3 Betrieben das Ergebnis der mykotoxikologischen Untersuchung artgleicher Stämme aus Faeces und Futtermittel dahingehend lautete, daß jeweils zwei Stämme aus Kot und Futtermittel Kojisäure bildeten und ihre Extrakte sich im Mäusetoxizitätstest einheitlich negativ verhielten. Je ein Stamm *P. roqueforti* aus Kot und Futtermittel erwies sich als PR-Toxin-Bildner und je ein *A. fumigatus*-Stamm aus Kot und Futtermittel als Produzent sowohl von Fumitremorgen C als auch von TR-2 Toxin. Zugleich waren die Extrakte der Stämme aus dem entsprechenden Betrieb toxisch für das Versuchstier Maus. Das Umgekehrte traf für *P. verrucosum* var. *cyclopium* in 2 Betrieben zu: Die Stämme aus Kot und Futtermittel verhielten sich bei allen Untersuchungen gleich. In 2 Betrieben jedoch erwiesen sich zwei Stämme dieser Spezies aus Kot als Penicillinsäure-Bildner, Stämme aus Futtermittel dagegen nicht.

Zugleich verlief allerdings der Tierversuch bei allen vier Stämmen negativ. Letztere Befunde charakterisieren also die Ausnahmen, während ansonsten doch relativ häufige Übereinstimmung vorlag.

Am häufigsten wurde von toxinbildenden Stämmen PR-Toxin produziert und zwar von jedem der diesbezüglich untersuchten *P.roqueforti*-Stämme. Dieser als Hepatotoxin charakterisierte Metabolit (RU-DONG WEI, 1977) soll auch für die Abortauslösung verantwortlich sein (GEDEK, 1977a). In einem der untersuchten Bestände fand sich bei 2 von 3 Kühen *P.roqueforti* im Kot. Ein kurz zuvor erfolgter Abort, dessen Ursache nicht aufgeklärt wurde, bei einer dieser Kühe könnte mit dem Vorhandensein von PR-Toxin in Zusammenhang gestanden haben. Von den *P.roqueforti*-Stämmen ist aber auch beschrieben, daß sie als karzinogenes Toxin Penicillinsäure bilden (MOUBASHER et al., 1978) sowie einen weiteren Metaboliten, nämlich Mycophenolsäure, deren Wirkung in vivo noch unbekannt ist (LAFONT, 1979). Als toxische Stoffwechselprodukte des *P.roqueforti* gelten weiterhin Roquefortin A, B und C (SCOTT und KENNEDY, 1976; OHOMO, 1977; ARNOLD, 1978). Das Vorhandensein dieser Toxine könnte dafür verantwortlich sein, daß der Mäusetoxizitätstest verschiedentlich ein positives Resultat lieferte.

Als zweithäufigster Toxinbildner erwies sich *A.fumigatus*. Alle isolierten Stämme bildeten mehrere tremorgene Toxine gleichzeitig, wie Fumitremorgen B und C, Verruculogen und TR-2-Toxin, wie sie von verschiedenen Autoren beschrieben sind (vgl. Tab. 6). Die tremorgene Wirkung konnte im Mäusetoxizitätstest bei jedem Chloroformextrakt der untersuchten Stämme bestätigt werden.

Für die Bildung der vorwiegend antibiotisch wirksamen Kojisäure, deren Toxizität als gering zu bezeichnen ist (WILSON, 1971), zeichneten alle *A.flavus*-Stämme verantwortlich. Da die Stämme in keinem Fall Aflatoxine produzierten und auch nur einer zugleich die als Neurotoxin und potentes Karzinogen anzusprechende Cyclopiazonsäure (FRANK, 1974; PURCHASE, 1974) bildete, bestätigt dies die von BAUER und GEDEK

(1978a) getroffene Feststellung, daß hierzulande aflatoxinbildende Stämme nicht, wohl aber Kojisäure und Cyclopiazonsäure produzierende Vertreter dieser Art anzutreffen sind. Die Bildung von Cyclopiazonsäure durch *A.flavus* ist außer durch BAUER und GEDEK (1978a) noch von LUK et al. (1977) und GALLAGHER (1978a) beschrieben. Eine neurotoxische Wirkung ließ sich im Mäusetoxizitätstest nicht nachweisen.

Die Produktion von Patulin und Griseofulvin durch jeden der isolierten Stämme des *P.griseofulvum* gleichzeitig stellt ein Novum dar. Der Literatur konnte nur entnommen werden, daß diese Spezies zur Bildung von Griseofulvin befähigt ist. Patulin ist in die Reihe der krebserzeugenden Toxine einzuordnen, Griseofulvin zählt dagegen zu den antibiotisch wirksamen Substanzen von geringer Toxizität. Die toxische Wirkung des Chloroformextraktes war bei allen Stämmen im Mäusetoxizitätstest eindeutig positiv und ist sicherlich auf die Wirkung von Patulin zurückzuführen (CIEGLER et al., 1971).

Von den isolierten Stämmen war *P.verrucosum* var. *cyclopium* am zweithäufigsten nachzuweisen. Auch in Futtermitteln ist diese Art sehr häufig anzutreffen (SCOTT et al., 1972; BAUER 1976). Von 21 Stämmen bildeten 9 Penicillinsäure. Bei Untersuchungen von BAUER (1976) war allerdings annähernd jeder dritte Stamm zur Synthese dieses Toxins fähig. Daß es in Futtermitteln selten zu finden ist (HESELTEINE, 1974), scheint darauf zurückzuführen zu sein, daß es sich sehr instabil verhält (SCOTT und SOMERS, 1968). *P. verrucosum* var. *cyclopium* verdient demnach Beachtung, da er auch neurotoxische Mykotoxine bilden soll (MOREAU, 1979; WILSON, 1968): Cyclopiazonsäure (HOLZAPFEL, 1968) und Penitrem A (CIEGLER und PITT, 1970) wurden bereits identifiziert. Außerdem wurden zwei neue Toxine, nämlich Xanthomegnin und Viomellein, deren Toxinwirkungen allerdings im Organismus noch weitgehend unerforscht sind, u.a. in Kulturen von *P.verrucosum* var. *cyclopium* nachgewiesen (STACK und MISLIVEC, 1978).

Beim Mäusetoxizitätstest zeigten annähernd alle Penicillinsäure-bildenden

Stämme toxische Wirkung. In drei Fällen ergab sich eine tremorgene Wirkung. Auch *P. verrucosum* var. *melanochlorum* war erstaunlich häufig im Untersuchungsmaterial vertreten. Ein Stamm bildete Penicillinsäure mit entsprechendem tremorgenem Effekt im Mäusetoxizitätstest. Über die neurotoxischen Eigenschaften dieser Spezies liegen bisher noch keine Veröffentlichungen vor. Auch für *P. chrysogenum* trifft dies zu. Von dieser Art waren etliche Stämme im Kot nachzuweisen. Zwei Extrakte zeigten positive Effekte im Tierversuch, einmal mit und einmal ohne Auftreten tremorgener Erscheinungen.

Griseofulvin wurde auch von dem einzigen *P. nigricans*-Stamm und von einem der mehrmals aufgetretenen Stämme von *P. brevicompactum* gebildet. Neurotoxische Wirkung im Tierversuch war nicht zu beobachten. Das Extrakt eines weiteren Stammes von *P. brevicompactum* zeigte allerdings deutliche Wirkung im Mäusetoxizitätstest, ohne daß neurotoxische Symptome auftraten. In der Literatur ist beschrieben, daß ein Stamm von *P. brevicompactum* das Neurotoxin Brevianamid A bildete (BIRCH und WRIGHT, 1970); von *P. nigricans* ist Penitrem A-Bildung bekannt (MANTLE, 1978). *P. paraherquei* war nur einmal zu isolieren. Das Chloroformextrakt enthielt Penicillinsäure und zeigte positiven Effekt im Mäusetoxizitätstest, jedoch ohne neurotoxische Symptome. Von dieser Spezies ist auch die Bildung von Verruculogen beschrieben (YOSHIZAWA, 1976). *P. expansum* gilt als potentieller Citrininbildner (GEDEK, 1977b; vgl. Tab. 6). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Bei den je einmal nachgewiesenen Stämmen von *A. amstelodami* und *A. candidus*, sowie bei den drei *A. nidulans*-Stämmen ist Mykotoxinbildung prinzipiell nicht auszuschließen. Alle drei Arten sind als Toxinbildner beschrieben (GEDEK, 1977b, vgl. Tab. 6; MARACHELLI et al., 1977; ITO et al., 1978). Der Mäusetoxizitätstest lieferte jedoch stets ein negatives Ergebnis.

Von allen untersuchten Stämmen bildete nur ein einziger Stamm, nämlich der Art *P. verrucosum* var. *verrucosum* aus Kraftfutter, Ochratoxin A und

zugleich Citrinin. Damit lag der Prozentsatz der zur Bildung dieser als Nephrotoxine anzusprechenden Mykotoxine befähigten Stämme unter 1 Prozent, ebenso wie bei Untersuchungen von BAUER und GEDEK (1978a).

5. ZUSAMMENFASSUNG

133 aus Rinderkot und 22 aus Futtermitteln isolierte Stämme der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* wurden in YES-Medium angereichert und die Kulturextrakte mittels Dünnschichtchromatographie und im Mäusetoxizitätstest auf die Befähigung zur Bildung von Mykotoxinen untersucht.

Vor der Isolierung der 155 Stämme wurde von 114 Kot- und 40 Futtermittelproben, die in 36 Betrieben gezogen worden waren, zunächst der Gehalt an Schimmelpilzen qualitativ und quantitativ bestimmt.

P. roqueforti (34 St.), *P. verrucosum* var. *cyclopium* (29 St.) bzw. var. *melanochlorum* (18 St.), *A. repens* (14 St.), *A. fumigatus* (13 St.) und *A. flavus* (10 St.) erwiesen sich als am häufigsten aus dem Untersuchungsmaterial züchtbar.

79 Stämme (72 aus Kot und 7 aus Futtermitteln) konnten als Bildner eines oder mehrerer Toxine ermittelt werden. Die Stämme produzierten die Multitoxine: Ochratoxin A (1 St.), Cyclopiazonsäure (1 St.), Citrinin (2 St.), Patulin (6 St.), Griseofulvin (8 St.), Kojisäure (10 St.) und Penicillinsäure (12 St.), sowie ferner die Tremorgene Verruculogen (6 St.), Fumitremorgen B (6 St.) und C (13 St.), TR-2-Toxin (13 St.) und PR-Toxin (34 St.). Keiner der geprüften Stämme bildete Aflatoxin B₁, B₂, G₁ oder G₂, Sterigmatocystin oder Citreoviridin.

Toxische Wirkungen im Tierversuch ohne Nachweis bekannter Toxine bei der DC-Analyse wurden festgestellt mit Extrakten folgender Spezies:

P. brevicompactum (1 St.), *P. verrucosum* var. *cyclopium* (1 St.), *P. frequentans* (1 St.) und *P. chrysogenum* (2 St.).

Es bestand offensichtlich eine Abhängigkeit im Auftreten bestimmter Arten im Kot von deren Vorkommen in den Futtermitteln, wobei die Art des Futtermittels sowie saisonale Gegebenheiten darauf Einfluß nehmen. In 10 Betrieben konnten bei Vorkommen der gleichen *Penicillium*- oder *Aspergillus*-Art

im Kot und im Futter jeweils auch eine Übereinstimmung bei den Stämmen in der Befähigung zur Toxinbildung nachgewiesen werden.

Erstmals wurde durch die Einbeziehung der Prüfung auf tremorgene Mykotoxine bei der Untersuchung von Aspergillen und Penicillien auf toxinbildende Eigenschaften ein Anteil von 54 Prozent toxinogener Stämme ermittelt.

SUMMARY

133 strains isolated from cattle dung and 22 strains isolated from feedstuff samples of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were enriched in YES-Medium and the cultures were analysed by thin-layer chromatography and controlled by a mouse toxicity test, if they might be producers of mycotoxins.

Before isolation of the 155 strains, the contents of moulds in 114 cattle dung samples and 40 feedstuff samples, which were taken from 36 farms, was proved qualitatively and quantitatively.

The most isolated mould strains out of the test material were of the species *P.roqueforti* (34 str.), *P.verrucosum* var. *cyclopium* (29 str.), *P.verrucosum* var. *melanochlorum* (18 str.), *A.repens* (14 str.), *A.fumigatus* (13 str.) and *A.flavus* (10 str.).

79 strains (72 from cattle dung and 7 from feedstuffs) producing one or more toxins could be identified. The following multitoxins were detected:

Ochratoxin A (1 str.), Cyclopiazonic acid (1 str.), Citrinin (2 str.), Patulin (6 str.), Griseofulvin (8 str.), Kojic acid (10 str.) and Penicillic acid (12 str.) and further the tremorgenic toxins Fumitremorgen B (6 str.) and Fumitremorgen C (13 str.), TR-2-toxin (13 str.) and PR-toxin (34 str.). None of the tested strains produced Aflatoxin B₁, B₂, G₁ or G₂, Sterigmatocystin or Citreoviridin.

Toxic effects in the toxicity test to mice could be detected with extracts of the following species: *P.brevicompactum* (1 str.), *P.verrucosum* var. *cyclopium* (1 str.), *P.frequentans* (1 str.) and *P.chrysogenum* (2 str.), while by thin-layer chromatography could not be analysed any known toxin.

Certain species showed an evident dependence between their occurrence in the excrements and in feedstuffs, influenced by season and of the kind of feedstuffs.

In 10 farms it was possible to prove that if the species of *Aspergillus* and *Penicillium* were the same in the feedstuffs and in the excrements, there was a correspondence in their behavior producing mycotoxins.

Due to testing the production of tremorgenic mycotoxins too, for the first time a percentage of 54 of toxigenic strains of *Aspergillus* and *Penicillium* was detected.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- | | |
|--|---|
| ARAI, T.,
ITO, T.,
KOYAMA, Y. | 1967: Antimicrobial activity of aflatoxins.
J.Bact., <u>93</u> , 59 - 64. |
| ALLER, B. | 1967: Fungi in the upper digestive and
respiratory tract of hens (<i>Gallus
domesticus</i>).
Brit.vet.J., <u>123</u> , 431 - 435. |
| ANGUS, K.W.,
GILMOUR, N.J.L.,
DAWSON, C. | 1973: Alimentary mycotic lesions in
cattle. A histological and cultu-
ral study.
J.med.Microbiol., <u>6</u> , 207 - 213. |
| ARNOLD, D.L.,
SCOTT, P.M.,
McGUIRE, P.F.,
HARWIG, J.,
NERA, E.A. | 1978: Acute toxicity studies on Roque-
fortine and PR-Toxin, metabolites
of <i>Penicillium roqueforti</i> , in the
mouse.
Food and Cosmetics Toxicology,
<u>16</u> , 369 - 371. |
| BAUCHOP, T. | 1979a: The rumen anaerobic fungi:
colonizers of plant fibre.
Ann.Rech.Vét., <u>10</u> , 246 - 248. |
| BAUCHOP, T. | 1979b: Rumen anaerobic fungi of cattle
and sheep.
Appl.environm.Microbiol.,
<u>38</u> , 148 - 158. |
| BAUER, J. | 1976: Untersuchungen zum Auf- und Abbau
von Stoffen mit antibiotischer Wir-
kung durch in Futtermitteln vorkommen-
de <i>Penicillien</i> und <i>Aspergillen</i> .
Vet.med.Diss., Ludwig Maximilians-
Universität, München. |
| BAUER, J. und
GEDEK, B. | 1978a: Zum Vorkommen toxinbildender
Schimmelpilze in Cerealien unter-
schiedlicher Herkunft.
Landw.Forsch., Sonderheft 35,
S. 562 - 569. |
| BAUER, J. und
GEDEK, B. | 1978b: Mykotoxikosen beim Schwein.
Prakt. Tierarzt, <u>59</u> , 780 - 785. |

- | | |
|---|---|
| BAUMGART, J. und
STOCKSMEYER, G. | 1976: Hitzeresistenz von Ascosporen des Genus <i>Byssoschlamys</i> .
<i>Alimenta</i> , <u>15</u> , 67. |
| BAUMGARTNER, E.,
LEUENBERGER, U.,
GAUCH, R. | 1978: Neue Bestimmungsmethode des Mykotoxins Patulin mit Hilfe der Dünnschichts- und Hochdruckschromatographie.
<i>J.Chromatogr.</i> , <u>161</u> , 303 - 309. |
| BIRCH, A.J. und
WRIGHT, J.J. | 1970: Studies in relation to biosynthesis - XVII. The structural elucidation and some aspects of the biosynthesis of the Brevianamides-A and -E.
<i>Tetrahedron</i> , <u>26</u> , 2329 - 2344. |
| BLASER, P. | 1976: Taxonomische und physiologische Untersuchungen über die Gattung <i>Eurotium</i> LINK ex FR.
<i>Sydowia</i> , <u>28</u> , 1 - 49. |
| BLASER, P. | 1977: Okophysiologie der Schimmelpilze. Separatdruck Chemische Rundschau, Heft 6, S. 21-27. |
| BOJARSKI, J. | 1970: Investigations on the presence of fungi and moulds in poultry carcasses.
<i>Excerpta Vet. Lublin</i> , <u>9</u> , 44. |
| BORKOWSKA, O.B.,
ESCOULA, L. | 1977: Production de la patulin en milieu liquide par des moisissures appartenant aux genres: <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> .
<i>Ann.Rech.Véter.</i> , <u>8</u> , 129 - 133. |
| BREWER, D.,
DUNCAN, J.M.,
SAFE, S.,
TAYLOR, A. | 1971: Ovine Ill-thrift in Nova Scotia I. The possible regulation of the rumen flora in cheep by the fungal flora of permanent pasture.
<i>J.Agric.Sci.</i> , <u>76</u> , 465 - 477. |
| BREWER, D.,
DUNCAN, J.M.,
SAFE, S.,
TAYLOR, A. | 1972: Ovine Ill-thrift in Nova Scotia IV. The survival at low oxygen partial pressure of fungi isolated from the contents of the ovine rumen.
<i>Canad.J.Microbiol.</i> , <u>18</u> , 1119 - 1128. |
| BRUNNER, R. und
MACHEK, G. | 1962: Die Antibiotika, Bd. II.
Hans Carl-Verlag, Nürnberg. |
| BUECHI, G.,
LUK, K.C.,
KOBBE, B.,
TOWNSEND, J.M. | 1976: Four new mycotoxins of <i>Aspergillus clavatus</i> related to <i>Tryptoquevaline</i> .
<i>J.org.Chem.</i> , <u>42</u> , 244 - 246. |

- BU LOCK, J.D. 1970: Biosynthese von Naturstoffen.
In BAUER, J., Untersuchungen zum Auf- und Abbau von Stoffen mit antibiotischer Wirkung durch in Futtermitteln vorkommende Penicillien und Aspergillen. Vet.med.Diss., Ludwig Maximilians-Universität, München.
- CIEGLER, A. 1969: Tremorgenic toxin from *Penicillium palitans*.
Appl.Microbiol., 18, 128 - 129.
- CIEGLER, A. und KURTZMANN, C.P. 1970: Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agricultural commodities.
Appl.Microbiol., 20, 761 - 764.
- CIEGLER, A. und PITT, J.I. 1970: Survey of the genus *Penicillium* for tremorgenic toxin production.
Mycopathol.appl., 42, 119 - 124.
- CIEGLER, A., DETROY, R.W., LILLEHOY, E.B. 1971: Patulin, Penicillic acid and other carcinogenic lactone.
In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL, S.J. Microbiol.toxins, 6, Fungal Toxins, Academic press, New York und London
- COLE, R.J., KIRKSEY, J.W., MOORE, J.H., BLANKENSHIP, B., DIENER, U.L., DAVIS, N.D. 1972: Tremorgenic toxin from *Penicillium Verruculosum*.
Appl. Microbiol., 24, 248.
- COLE, R.J. und KIRKSEY, J.W. 1973: The mycotoxin Verruculogen: a 6-O-Methylindole.
J.Agr.Food Chem., 21, 927.
- COLE, R.J., KIRKSEY, J.W., MORGAN-JONES, G. 1975: Verruculotoxin, a new mycotoxin from *Penicillium verruculosum*.
Toxicol.appl.Pharmacol., 31, 465 - 468.
- COLE, R.J., KIRKSEY, J.W., DORNER, J.W., WILSON, D.M., JOHNSON, J.C., JOHNSON, A.N., BEDELL, D.M., SPRINGER, J.P., CHEXAL, K.K., CLARDY, J.C., COX, R.H. 1977a: Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage.
Agric.Food Chem., 25, 826 - 380.

- COLE, R.J. 1977b: Tremorgenic Mycotoxins.
In RODRICKS, J.V., HESSELTINE, C.W.
MEHLMAN, M.A. (eds.).
Mycotoxins in human and animal health.
Pathotox Publishers Inc., G. Fischer
Verlag, Stuttgart, New York
- COOKE, W.B. 1963: A laboratory guide of fungi in polluted
waters, sewage and sewage treatment
systems.
Pub.Health Serv.Pub., 999 - WP-1,
USDHEW, Cincinnati, Ohio.
- COOKE, W.B. und
LUDZCK, F. 1958: Predacious fungus behavior in acti-
vated sludge systems.
Sewage Ind.Wastes, 30, 1490 - 1491.
- COOKE, W.B. und
PIPES, W.O. 1970: The occurrence of fungi in activated
sludge.
Mycopathol. appl., 40, 249 - 270.
- DAVIS, N.D.,
DIENER, U.L.,
ELDRIDGE, D.W. 1966: Production of Aflatoxin B₁ und G₁ by
Aspergillus flavus in a semisynthetic
medium.
Appl.Microbiol., 14, 378 - 380.
- DAVIS, N.D.,
SEARCY, J.W.,
DIENER, U.L. 1969: Production of Ochratoxin A by Asper-
gillus ochraceus in a semisynthetic
medium.
Appl.Microbiol., 17, 742 - 744.
- DAVIS, N.D.,
DALBY, D.K.,
DIENER, U.L.,
SANSING, G.A. 1975: Medium - Scale production of Citrinin
by Penicillium citrinum in a semisyn-
thetic medium.
Appl.Microbiol., 29, 118 - 120.
- DAVIES, R.P. und
LEESE, M. 1968: Filamentous fungi in the transient flora
of alimentary tract.
Sabouraudia, 6, 324 - 329.
- DICKINSON, C. und
UNDERHAY, V.H.S. 1977: Growth of fungi in cattle dung.
Trans.Br.mycol.Soc., 69, 473 - 477.
- DIENER, U.L.,
MORGAN-JONES, G.,
HAGLER, W.M.,
DAVIS, J.N.D. 1976: Mycoflora of activated sewage sludge.
Mycopathol.appl., 58, 115 - 116.

- DOYLE, M.P. und
MARTH, E.H. 1975a: Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, I. Effects of moist heat age of conidia and sporulation medium. *J.Milk Food Technol.*, 38, 678.
- DOYLE, M.P. und
MARTH, E.H. 1975b: Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, II. Effects of pH and buffers, glucose, sucrose and sodium chloride. *J.Milk Food Technol.*, 38, 750.
- ENGEL, G. 1977: Untersuchungen zur Bildung von Mykotoxinen und deren quantitativer Analyse, VI. Citreoviridin. *J.Chromatogr.*, 130, 293 - 297.
- ENGEL, G. und
TEUBER, M. 1978: Simple aid for the identification of *Penicillium roqueforti* - Tom. Growth in acetic acid. *Europ.J.appl. Microbiol.Biotechnol.*, 6, 107 - 111.
- FRANK, H.K. 1974: Toxische Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. *Alimenta*, 3, 98 - 101.
- GALLAGHER, R.T. und
LATCH, C.C.M. 1977: Production of the mycotoxins Verruculogen and Fumitremorgen B by *Penicillium piscarium* Westling. *Appl. and environm.Microbiol.*, 33, 730 - 731.
- GALLAGHER, R.T.,
RICHARD, J.L.,
STAHR, H.M.,
COLE, R.J. 1978a: Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Mycopathol.appl.*, 66, 31 - 36.
- GALLAGHER, R.T. und
WILSON, B.J. 1978b: Aflatrem, the tremorgenic mycotoxin from *Aspergillus flavus*. *Mycopathol.appl.*, 66, 183 - 185.
- GEDEK, B. 1969: Zur Bedeutung von Mykotoxinen. *Die blauen Hefte*, 41, 32 - 38.

- GEDEK, B. 1970: Zur schädigenden Wirkung stark keimhaltiger Futtermittel. Tierärztliche Umschau, 7, 335 - 341.
- GEDEK, B. 1973: Futtermittelverderb durch Bakterien und Pilze und seine nachteiligen Folgen. Übers.Tierernährung, 1, 45 - 56.
- GEDEK, B. 1974: Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futtermittelkontrolle. Dt.Tierärztl.Wschr., 81, 37 - 40 und 65 - 68.
- GEDEK, B. 1977a: Schimmelpilze und Hefen in Cerealien und Futtermitteln. Seperatdruck Chem.Rundschau, Heft 6, S. 60 - 68.
- GEDEK, B. 1977b: Kind and frequency of toxin production by cereals contaminating Aspergilli and Penicillia. Ann.Nutr.Alim., 31, 467 - 475.
- GEDEK, B. 1980: Kompendium der medizinischen Mykologie. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- HENDRICKSON, D.A. und GRANT, D.W. 1971: Aflatoxin formation in sterilized feedlot manure and fate during simulated water treatment procedures. Bull.environm.Contaminat. & Toxicol.
- HESELTIME, C.W. 1974: Natural occurrence of mycotoxins in cereals. Mycopathol.appl., 53, 141 - 153.
- HOLZAPFEL, C.W. 1968: The isolation and structure of Cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of Penicillium cyclopium WESTLING. Tetrahedron Lett., 24, 2101 - 2119.
- HRUBÝ, S. und MAREŠOVÁ, P. 1970: Příspěvek ke sledování mikrobicidních účinku trávicích šťav. (Ein Beitrag zur Klärung der mikrobiziden Wirkung von Verdauungssäften) Čs.Hyg., 141, 225 - 231.

- HYDE, M.B. und
GALLEYMORE, H.B. 1951: The subepidermal fungi of cereal grains; II. The nature, identity and origin of the mycelium in wheat. *Ann.appl.Biol.*, 38, 348 - 356.
- JOHNSON, C.L. und
PREECE, T.F. 1979: Natural history of *Pilobolus Kleinii*: experiments with sporangia in the cow digestive tract and the early stages of growth. *Trans.Brit.mycol.Soc.*, 72, 453 - 457.
- JTO, Y.,
OHTSUBO, K.,
YOSHIHIRA, K.,
SEKITA, S.,
NATORI, S.,
TSUNODA, H. 1978: Toxic effects of rice culture of *A.candidus* and its metabolite, Xanthoascidin, on japanese quails. *Jap.exper.Med.*, 48, 187 - 191.
- KLARE, H.J. 1970: Die Bedeutung des Darminhaltes von Schlachttieren als Ursache für die Kontamination von Fleisch und Fleisch-erzeugnissen mit Schimmelpilzen. *Fleischwirtschaft*, 50 1507.
- KLARE, H.J. 1971: Über das Vorkommen von Schimmelpilzen in den Faeces von Schwein und Rind in fleischhygienischer Sicht. *Vet.med.Diss.*, Justus Liebig-Univ., Gießen.
- KOLB, E. 1962: Lehrbuch der Physiologie der Haus-säugetiere. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- LACEY, J. 1975: Airborne spores in pastures. *Trans.mycol.Soc.*, 64, 265 - 281.
- LAFONT, P.,
DEBEAUPUIS, J.-P.,
GAILLARDIN, M.,
PAYEN, J. 1979: Production of Mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* strains. *Appl.environm.Microbiol.*, 37, 365 - 368.
- LAUBER, H.P. 1971: Variabilität und Kernverhältnisse bei *Botrytis cinerea*. *Schweiz.landwirtschaftl.Forsch.*, 10, 1 - 64.

- LE BARS, J. und
ESCOULA, L.
- LEISTNER, L.
- LEISTNER, L.
- LEISTNER, L.,
HOFMANN, G.,
TANAKA, K.,
SATO, N.,
TAUCHMANN, F.
- LEISTNER, L.,
STILL, P.E.,
ECKHARDT, C.,
MANABE, M.,
HALLS, N.A.,
TANAKA, K.,
MAING, J.,
TAUCHMANN, F.
- LING, K.H.,
YANG, C.K.,
PENG, F.-T.
- LOEFFLER, W.
- 1973: Champignons toxigènes, des
fourrages secs et ensilés.
Bull.Off.int.Epiz, 79, 1213 - 1246.
- 1974: Mykotoxine. Abschlußbericht zum
Forschungsvorhaben.
In San 1671: Nachweis von Toxinen
mikrobiellen Ursprungs unter beson-
derer Berücksichtigung der Mykotoxine.
Institut für Bakteriologie und Histolo-
gie der Bundesanstalt für Fleischfor-
schung, Kulmbach.
- 1977: Mykotoxine gebildet von Fusarien und
Penicillien.
Studie, erarbeitet im Auftrag des Bun-
desministers der Verteidigung, 121
Seiten.
- 1978a: Neurotoxische Mycotoxine.
Forschungsbericht aus dem Institut
für Bakteriologie und Histologie der
Bundesanstalt für Fleischforschung,
Kulmbach.
- 1978b: Penicillien-Toxine.
Abschlußbericht des von der Deutschen
Forschungsgemeinschaft unterstützten
Forschungsvorhabens "Untersuchung
über Mykotoxine, die für Fleischwaren
von Bedeutung sind".
Le 207/5, 54 Seiten.
- 1979: Territrems, tremorgenic mycotoxins
of *Aspergillus terreus*.
Appl.enviro nm.Microbiol., 37, 355 -
357.
- 1965: Systematische Probleme um einige
Pilze, die als Krankheitserreger
bekannt oder dafür verdächtig sind.
In GRIMMER, H., RIETH, H.,
Krankheiten durch Schimmelpilze
bei Mensch und Tier.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, 4 - 9.

- LUK, K.C.,
KOBBE, B.,
TOWNSEND, J.M.
- 1977: Production of Cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* LINK. Appl. environm. Microbiol., 33, 211 - 212.
- MANTLE, P.G.,
DAY, J.B.,
HAIGH, C.R.,
PENNY, R.H.C.
- 1978: Tremorgenic mycotoxins and incoordination syndromes. Vet. Rec., 103, 403.
- MARCHELLI, R.,
DOSSENA, A.,
POCHINI, A.,
DRADI, E.
- 1977: The structures of five new didehydropeptides related to Neoechinulin, isolated from *A. amstelodami*. J. of the Chem. Soc., Perkin I, 713 - 717.
- MCGINNIS, R.M.,
PADHYE, A.A.,
AJELLO, L.
- 1974: Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. Microbiol., 28, 218 - 222.
- MILITZER, S.
- 1968: Mykologische Untersuchungen an Mais-silagen aus dem Raum Berlin. Diss. vet. med., Humboldt Universität, Berlin.
- MISLIVEC, P.B. und
TUIITE, J.
- 1970: Spezies of *Penicillium* occurring in freshly-harvested and in stored dent corn kernels. Mycologia, 62, 67 - 74.
- Mitteilungen aus dem
Bundesgesundheitsamt:
- Analysenverfahren zur Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ in Lebensmitteln. Bundesgesundheitsblatt 18, 230 - 233.
- MOREAU, Cl.
- 1979: Troubles nerveux et digestifs liés à la consommation , par les animaux, d'aliments contaminés par des *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Rev. de Mycol., 43, 227 - 238.
- MOUBASHER, A.H.,
ABDEL-KADER, M.I.A.,
EL-KADY, J.A.
- 1978: Toxigenic fungi isolated from roquefort cheese. Mycopathol. appl., 66, 187 - 190.

- MOUSTAFA, A.F. und
KAMEL, S.M. 1976: A study of fungal spore populations
in the atmosphere of Kuwait.
Mycopathol.appl., 59, 29 - 35.
- MÜLLER, E. 1966: Fruchtkörperbildung und Variabilität
morphologischer Merkmale bei *Leptosphaerulina australis* McALPINE.
Ber.Schweiz.Bot.Ges., 185 - 229.
- MÜLLER, E. und
LOEFFLER, W. 1971: Mykologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- MÜLLER, E. 1974: Was sind Schimmelpilze und Hefen?
Alimenta 2, 50 - 53.
- NAGEL, D.W.,
PACHLER, K.G.R.,
STEYN, P.S.,
WESSELS, P.L.,
GAFNER, G.,
KRUGER, G.J. 1974: X-ray structure of Oxaline a novel
alkaloid from *Penicillium oxalicum*.
J.Chem.Soc., 18, 1021.
- NELSON, R.E. und
WILHELM, S. 1958: Thermal death range of *Verticillium*
 alboatrum.
Phytopathol., 48, 613.
- NYIREDY, L.,
ETTER, L.,
FESUES, J.,
MAYER, G. 1974: A peneszgombak "sporainak" sorsa a
fiatal scibek emesztocsvéiben.
(Über das Schicksal der "Sporen" von
Schimmelpilzen im Verdauungsapparat
von jungen Küken)
Magyar allatorvosok Labja, 29, 608 -
612.
- OHMOMO, S.,
UTAGAWA, T.,
ABE, M. 1977: Identification of Roquefortine C produced
by *Penicillium roqueforti*.
Agric.Biol.Chem., 41, 2097 - 2098.
- OHTSUBO, K. und
SAITO, M. 1978: Toxicity to mice and Hela cells and
preliminary chemical examination
of five fungi isolated from foodstuffs.
Japan.J.exper.Med., 48, 257 - 264.
- ORTH, R. 1973: Tagungsbericht: Mycotoxin-Symposium
1972.
Mykosen 16, 375 - 376.

- PELHATE, J. 1977: Maize silage: incidence of moulds during conservation.
Folia Vet.Lat.VII, 1 - 16.
- PETER, A. 1966: Beobachtungen über parenterales Auftreten oral verabfolgter fütterungs-
apathogener Mikroorganismen.
Zbl.Bakt.I A Orig., 201, 85 - 90.
- POLONELLI, L.,
MORACE, G.,
DELLE MONACHE, F.,
SAMSON, R.A. 1978: Studies on the PR-Toxin of Peni-
cillium roqueforti.
Mycopathol.appl., 66, 99 - 104.
- PREECE, T.F. und
JOHNSON, C.C. 1978: Natural history of pilobolus Kleinii:
Trapping air-borne sporangia over
cow faeces in grass.
Trans.Brit.mycol.Soc., 71, 57 - 63.
- PRZYBYLSKI, W. 1975: Formation of aflatoxin Derivatives
on thin-layer chromatographic plates.
J.Ass.off.anal.Chem., 58, 163 - 164.
- PURCHASE, I.F.H. 1974: Mycotoxins.
Elsevier, Amsterdam, S. 149.
- REHM, H.-J. 1970: Pilze in Fruchtsäften und die Gefähr-
lichkeit ihrer Stoffwechselprodukte.
Flüssiges Obst, 37, 342.
- RICHARD, J.L. und
ARP, L.H. 1979: Natural occurrence of the mycotoxin
Penitrem in a moldy cream cheese.
Mycopathol.appl., 67, 107 - 109.
- RICHTER, H. 1975: Zum Vorkommen von Schimmelpilzen
und Hefen in Futter und Sperma von
Besamungsbullen. Untersuchungs-
methoden zu ihrem Nachweis und die
mögliche Bedeutung von Schimmel-
pilzen und Hefen bei Befruchtungs-
störungen bisher unbekannter Genese.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr., 88,
224 - 229.

- | | |
|---|--|
| RIETH, H. | 1974: Humanpathogene Hefen und Schimmelpilze in Lebens- und Futtermitteln. <i>Alimenta</i> , <u>2</u> , 65 - 72. |
| ROLLE, M. und
KOLB, E. | 1954: Zur Frage des Vorkommens von Schimmelpilzen (<i>Mucoraceae</i> , <i>Aspergillaceae</i>) im Magen-Darmkanal der Haustiere. <i>Zschr.Hyg.</i> , <u>139</u> , 415 - 420. |
| ROLLE, M. und
MAYR, A. | 1978: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. |
| RU-DONG WEI,
SCHNOES, H.K.,
HART, P.A.,
STRONG, F.M. | 1975: The structure of PR-Toxin, a mycotoxin from <i>Penicillium roqueforti</i> . <i>Tetrahedron</i> , <u>31</u> , 109 - 114. |
| RU-DONG WEI,
GAI-XUONG LIU | 1978: PR-Toxin production in different <i>Penicillium roqueforti</i> strains. <i>Appl. and environm.Microbiol.</i> , <u>35</u> , 797 - 799. |
| SAITO, M. | 1971: Screening test using Hela cells and mice for detection of mycotoxin producing fungi isolated from foodstuffs. An additional report on fungi collected in 1968 and 1969. <i>Japan J.exper.Med.</i> , <u>41</u> , 1 - 20. |
| SAITO, M. | 1974: Screening text using Hela cells and mice for detection of mycotoxin producing fungi isolated from foodstuffs. An additional report on fungi collected in 1968 and 1969. <i>Japan J.exper.Med.</i> , <u>44</u> , 63 - 82. |
| SCHMIDT, H.L. | 1968: Zur Mikrobiologie der Handelsfuttermittel. <i>Landwirtschaftl.Forsch.</i> , <u>21</u> , 146 - 163. |
| SCHMIDT, H.L. | 1975: Über Vorkommen und Häufigkeit von hohen Pilzkeimgehalten sowie einzelnen Pilzarten in Futtermitteln. <i>Landw.Forsch.</i> , <u>28</u> , 224 - 234. |

- SCHMIDT-LORENZ, W. 1977: Hitze-Inaktivierung von Schimmelpilzen und Hefen in Lebensmitteln. Separatdruck Chemische Rundschau, Heft 6, S. 28 - 35.
- SCHROEDER, H.W.,
COLE, R.J.,
HEIN, H.,
WIRSEY, J.W. 1975: Tremorgenic mycotoxins from *A.caespitosus*. Appl.Microbiol., 29, 857.
- SCOTT, P.M. und
SOMERS, E. 1968: Stability of Patulin and Penicillic acid in fruit juice and flour. J.agr.Food Chem., 16, 483 - 485.
- SCOTT, P.M.,
LAWRENCE, J.,
VAN WALBEEK, W. 1970: Detection of mycotoxins by thinlayer chromatography: Applications to screening of fungal extracts. Appl.Microbiol., 20, 839 - 842.
- SCOTT, P.M.,
VAN WALBEEK, W.,
KENNEDY, B.,
ANYETI, D. 1972: Mycotoxins (Ochratoxin A., Citrinin and Sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. J.agr.Food Chem., 20, 1103 - 1109.
- SCOTT, P.M. und
KENNEDY, B.P.C. 1976: Analysis of blue cheese for Roquefortin and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. J.Agric.food Chem., 24, 865 - 868.
- SEELIGER, H.P.R. und
GEDEK, B. 1967: Hefe- und Schimmelpilze. In BRAUN, O.H., Methoden und Ergebnisse der bakteriologischen Stuhluntersuchungen. Spez. Teil. Zbl.Bakt. I.Orig., 203, 518 - 546.
- SHEAR, C.L. und
DODGE, B.O. 1927: Life histories and heterothallism of the red breadmold fungi of the *Monilia sitophila* group. J.Agric.Res., 34, 1019.
- SHREEVE, B.J.,
PATTERSON, P.S.P.,
ROBERTS, B.A.,
MACDONALD, S.M. 1979: Isolation of potentially tremorgenic fungi from pasture associated with a condition resembling Ryegrass Staggers. Vet.Rec., 103, 209 - 210.

- | | |
|--|---|
| SIEBER, R. | 1978: Zur Frage der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von in der Käsefabrikation verwendeten Schimmelpilzkulturen. Zschr.Ernährungswiss., <u>17</u> , 112 - 123. |
| SMALL, J. | 1946: pH and plants. Tindall, London, Baillière. |
| SMITH, D.F. und
LYNCK, G.P. | 1973: <i>Aspergillus fumigatus</i> in samples of moldy silage. J.Dairy Sci., <u>56</u> , 828 - 829. |
| SMITH, H.W. | 1965: Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. J.of Path. and Bact., <u>89</u> , 95 - 122. |
| SOMMER, N.F.,
BUCHANAN, J.R.,
FORTLAGE, R.J. | 1974: Fungus and enzyme activity in fresh apricots as related to softening of canned fruits. Calif.Agric., <u>28</u> , 8. |
| SPLITTSTOESSER, D.F.,
KUSS, F.R.,
HARRISON, W.,
PREST, D.B. | 1971: Incidence of heatresistant molds in eastern orchards and vineyards. Appl.Microbiol., <u>21</u> , 335. |
| STACK, H.E. und
RODERICKS, J.V. | 1971: Method for analysis and chemical confirmation of Sterigmatocystin. J.Ass.Off.anal.Chem., <u>54</u> , 86 - 90. |
| STACK, M.E. und
POHLAND, A.F. | 1975: Collaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of Aflatoxin. J.Ass.Off.anal.Chem., <u>58</u> , 110 - 113. |
| STACK, M.E. und
MISLIVEC, P.B. | 1978: Produktion of Xanthomegnin and Viomellein by isolates of <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> and <i>Penicillium viridicatum</i> . Appl.environm.Microbiol., <u>36</u> , 552 - 554. |
| THURSTON, J.R.,
CYSEWSKI, S.J.,
RICHARD, J.L. | 1979: Exposure of rabbits to spores of <i>Aspergillus fumigatus</i> or <i>Penicillium</i> sp.: Survival of fungi and microscopic changes in the respiratory and gastrointestinal tracts. Ass.J.Vet.Res., <u>40</u> , 1443 - 1449. |

- TRENK, H.L. und
CHU, F.S. 1971: Improved Detection of Ochratoxin A on thin-layer plates. J.Ass.Off.anal.Chem., 54, 1307 - 1309.
- UENO, Y. 1971: Production of Citreoviridin, a neurotoxic mycotoxin of *Penicillium citreoviride* Biourge. In PURCHASE (ed.), J.F.H., Symposium on mycotoxins in human health. McMillan, London, S. 115.
- UENO, Y. und
UENO, I. 1972: Isolation and acute toxicity of Citreoviridin, a neurotoxic mycotoxin of *Penicillium citreoviride* Biourge. Japan J.exper.Med., 42, 91 - 105.
- UENO, Y. 1974: Citreoviridin from *Penicillium citreoviride* Biourge. In PURCHASE, J.F.H., Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 283 - 302.
- VAN WALBEEK, W.,
SCOTT, P.M.,
THATCHER, F.S. 1968: Mycotoxing from food-borne fungi. Canad. J.Microbiol., 14, 131 - 137.
- VOLKHEIMER, G. 1963: Über parazelluläre, chylöse Resorptionsmechanismen. Zbl.ges.inn.Med., 18, 949.
- VOLKHEIMER, G. 1972: Persorption, Gastroentologie und Stoffwechsel, Bd. 2. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- WILSON, B.J. und
WILSON, C.H. 1964: Toxin from *Aspergillus flavus*: production on food materials of a substance causing tremors in mice. Science, 144, 177.
- WILSON, B.: 1968: Tremorgenic Toxin from *Penicillium cyclopium* grown on food materials. Nature, London, 220, 77 - 78.
- WILSON, B.J. 1971: Miscellaneous *Aspergillus* toxins. In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL, S.J., 1971: Microbial toxins, Vol. VI, fungal toxins. Academic Press, New York, London, 208 - 298.

- WÖHLBIER, W. 1966: Die Futtermittel.
DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- WYATT, R.D. 1977: Production of Citrinin by *Penicillium*
citrinum in different liquid media.
Poult.Sci., 56, 1342 - 1344.
- YAMAZAKI, M., 1971: Tremorgenic toxins from *Aspergillus*
SUZUKI, S., *fumigatus* fres.
MIYAKI, K. *Chem.Pharm.Bull.*, 19, 1739 - 1740.
- YOSHIZAWA, T., 1976: Tremorgenic mycotoxin from *Peni-*
MOROOKA, N., *cillium paraherquei*.
SAWADA, Y., *Appl. and environm. Microbiol.*,
UDAGAWA, S. 32, 441 - 442.

LEBENS LAUF

Am 28. Juli 1944 wurde ich, Harold Wolfhard Martin Schreiber, als Sohn des Realschullehrers Alfred Schreiber und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Plischke, in Friedeberg, Kreis Freiwaldau geboren. Nach fünfjähriger Volksschulzeit und neunjähriger Gymnasialzeit legte ich im Juni 1964 am Wittelsbacher Gymnasium München das Abitur ab.

Von Oktober 1964 bis September 1966 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr und beendete diesen als Leutnant d. Res. Vom Wintersemester 1966/67 bis zum Sommersemester 1969 studierte ich an der Pädagogischen Hochschule in München. Im Juli 1969 legte ich hier die 1. Lehramtsprüfung ab.

Von September 1969 bis Juli 1972 war ich in Goldbach bei Aschaffenburg und in München als Grundschullehrer tätig. Die 2. Lehramtsprüfung absolvierte ich im Juli 1972.

Nach einjähriger Wartezeit begann ich im Wintersemester 1973/74 mit dem Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Das Staatsexamen legte ich im Herbst 1978 ab und erhielt die Approbation als Tierarzt mit Wirkung vom 3. Januar 1979. Bis Juli 1979 war ich als Assistent in einer Großtierpraxis tätig.

Mit den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit begann ich im April 1979 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Seit 24.3.1975 bin ich mit der Lehrerin Birgit Schreiber, geb. Zeitz, verheiratet. Am 20.8.1976 wurde unser Sohn Maximilian geboren.

Frau Professor Dr. Gedek möchte ich für die Überlassung des Themas,
Herrn Dr. Bauer für die Betreuung der Arbeit und die mir jederzeit gern
gewährte Hilfe ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt aber Herrn Prof.Dr.DDr. h.c. Mayr für die
mir bereitwillig gewährte Arbeitsmöglichkeit und sein stetes Interesse
an meiner Arbeit.

